

Funktionale Erweiterung der Capture Compound Mass SpectrometryTM – Synthese und Anwendung innovativer Capture CompoundsTM

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

in Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Chem. Matthias Baranowski

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. PD Dr. Michael J. Sefkow
 2. Prof. Dr. Stefan Hecht

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2012

Die von der caprotec bioanalytics GmbH entwickelte und vermarktete Capture Compounds Mass SpectrometryTM (CCMS-Technologie) ermöglicht die spezifische Isolierung und Identifizierung von Proteinen, basierend auf ihre gezielte Wechselwirkung mit kleinen trifunktionalen Moleküle (sog. Capture CompoundsTM). Dadurch wird sowohl eine Reduzierung der Komplexität zellulärer Proteingemische als auch eine Anreicherung niedrig abundanter Proteine erreicht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese von neuartigen Capture Compounds, die dazu dienen sollen, unterschiedliche biochemische Fragestellungen zu beantworten und das Anwendungsspektrum der CCMS-Technologie stark erweitern. So wurde erfolgreich gezeigt, dass eine selektive Markierung spezifischer Proteine innerhalb eines Zelllysates mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich ist. Des Weiteren gelang erstmals eine Aktivierung von aromatischen Aziden über die Anregungswellenlänge der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Als sterisch anspruchslose photoreaktive Gruppen wurden aliphatische Diazirine erfolgreich in Capture Compounds eingesetzt und die Click-Chemie im Rahmen der CCMS-Technologie eingeführt. Eine Kombination von aliphatischen Diazirinen und der Click-Chemie gestattet die Synthese von sehr kleinen, potentiell permeablen Capture Compounds (CCs). Diese „Mini“-CCs können zukünftig die Grundlage darstellen, die CCMS-Technologie in intakten und lebenden Zellen anzuwenden. Durch die erfolgreiche Entwicklung eines photospaltbaren azidtragenen Linkers wurde weiter das Click & Cleave Konzept als Erweiterung der Click-Chemie eingeführt. Eine andere Art der Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes, die auch eine funktionale Isolierung von nativen Proteinen ermöglicht, erfolgte durch die Verwendung von spaltbaren photoreaktiven Verbindungen. Dazu erfolgte die Synthese einer neuen, perfluorierten, spaltbaren Photoreaktivitätsfunktion und eine genaue Validierung der notwendigen Spaltungsbedingungen. Weitere Untersuchungen von aromatischen Aziden als Reaktivitätsfunktion zeigten, dass die genaue Positionierung eines Azides am Aromaten für eine erfolgreiche Proteinisolierung nicht essentiell ist. Auch ein unterschiedlicher Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion oder der Austausch des Zentralatoms (Kohlenstoff gegen Stickstoff) konnte keinen großen Einfluss auf das Capture Verhalten nehmen. In allen Fällen gelang Isolierung und Identifizierung der Zielproteine. Dies spricht für die Robustheit der CCMS-Technologie.

The Capture Compound Mass SpectrometryTM (CCMS-Technology) is a novel technology developed and marketed by caprotec bioanalytics GmbH. CCMS allows the isolation of sub-proteomes based on specific interactions of target proteins with synthetic small molecules, called Capture Compounds (CCs). In this way, CCMS affords the functional reduction of complex protein mixtures that derived from e.g. cell lysates, and the enrichment and identification of low abundant proteins.

In the present work, the synthesis of different novel Capture Compounds that helps studying different biological problems and overcoming present technological limitations of CCMS is described. Thus, it was successfully demonstrated, that it is possible to covalently mark specifically interacting proteins in complex protein mixture with fluorescent dyes. Additionally, a new mode of activation of an aromatic azide via photo-excitation of the fluorescent dye was found. A small photo-reactive group, an aliphatic diazirine, that provide low sterical hindrance was successfully employed in the synthesis of novel Capture Compounds. With a combination of such aliphatic diazirines and the Click chemistry it is possible to create very small, potentially permeable Capture Compounds. These compounds will be the background for the use of CCMS in living cells. Furthermore, the development of a new photo cleavable azid-biotin-linker has been successfully accomplished that will be employed in the Click & Cleave extension of the CCMS-technology primarily for reducing the unspecific background. A second route to reduce the unspecific background implement chemically cleavable photo reactive groups, based on azoarenes. Such cleavable reactivity functions can be also used for isolation of native proteins. A novel perfluorinated, cleavable azido-azoarene was synthesized and the conditions for cleavage were tested. Further, the influence of the position of the reactivity group was investigated. It has been shown that the capture of proteins is not very much affected by the position of the azid group in aromatic azids. In addition, different linker lengths between the aromatic diazirine as a photo reactive group and the residual molecule as well as different core structures (carbon atom vs. nitrogen atom) have been tested. In both cases the influence in capture of proteins is limited and the expected protein could be isolated and identified in all cases. These results led to the conclusion, that the Capture Compound Mass Spectrometry is a very robust and highly efficient technology for isolation and identification of proteins.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2008 bis Oktober 2011 unter Leitung von Herrn PD Dr. Michael J. Sefkow in der caprotec bioanalytics GmbH Berlin-Adlershof angefertigt.

Herrn PD Dr. Michael J. Sefkow gilt mein Dank für dieses interessante und vielseitige Thema, dessen Bearbeitung mir durch Anregungen seinerseits, wissenschaftliche Diskussionen und regelmäßige Motivationsschübe viel Freude bereitet hat.

Herrn Prof. Dr. Stefan Hecht möchte ich für die Beurteilung der vorliegenden Arbeit danken.

Ich danke den Mitarbeitern von caprotec für das familiäre Arbeitsklima der letzten Jahre, wobei besonders Dr. Simon F. Michaelis und sein Team der medizinischen Chemie erwähnt werden muss.

Neben meinen Eltern, der gesamten Familie und meinen Freunden gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Proteomics - Von der 2D-Gelelektrophorese bis zur CCMS-Technologie	1
1.2 Das Capture Experiment.....	5
1.3 Capture Compounds und ihre Anwendung	7
1.4 Photolabile Gruppen in biochemischen Systemen	8
1.5 Verwendete Selektivitätsfunktionen.....	13
1.5.1 <i>S</i> -Adenosylhomocystein	13
1.5.2 Cyclisches Adenosinmonophosphat.....	14
1.5.3 Vorinostat	15
1.6 Einschränkungen der CCMS-Technologie.....	16
1.7 Click-Reaktionen	20
2 Zielstellung & Motivation.....	23
3 Ergebnisse	25
3.1 Fluoreszierende Scaffolds & Capture Compounds	25
3.1.1 Stabilitätsuntersuchungen – Photostabilität von Farbstoffe	25
3.1.2 Stabilitätsuntersuchungen – Biostabilität von Fluorescein.....	31
3.1.3 Synthese von Fluorescein-Scaffolds und Capture Compounds.....	32
3.1.4 Photochemische Eigenschaften von Fluorescein-Scaffolds	36
3.1.5 Kapazität von Antikörper beschichteten Magnetbeads	43
3.1.6 Fluoreszenzmarkierung von Zielproteinen.....	44
3.1.7 Rhodamin-Scaffolds und Capture Compounds	45
3.1.8 Zusammenfassung	47
3.2 Einfluss der unterschiedlichen Positionierung der Azidfunktion	48
3.2.1 Synthese <i>o</i> - und <i>m</i> -Azido bzw. <i>m,m</i> -Bisazido-Scaffold.....	48
3.2.2 Vergleich von UV-Spektren & Photostabilität.....	49

3.2.3 Synthese von cAMP-Capture Compounds.....	56
3.2.4 Vergleichendes Capturen.....	57
3.2.5 Zusammenfassung	59
3.3 Spaltbare Reaktivitätsfunktion	60
3.2.1 Synthese eines Scaffolds & cAMP-Capture Compound.....	60
3.3.2 Capture Experiment mit einer Azo-cAMP-Capture Compound	64
3.3.3 Entwicklung einer neuen spaltbaren Reaktivitätsfunktion.....	66
3.3.4 UV-Verhalten spaltbarer Reaktivitätsfunktionen	68
3.3.5 Zusammenfassung	71
3.4 Stickstoff als zentrales Verzweigungselement in Scaffolds	72
3.4.1 Darstellung von verschiedenen Biotin-Linkern.....	73
3.4.2 Darstellung eines Amin-Scaffoldes mit 1,3-Abstand.....	75
3.4.3 Darstellung eines Amin-Scaffoldes mit 1,4-Abstand.....	77
3.4.4 Darstellung eines Amin-Scaffoldes mit 1,6-Abstand.....	78
3.4.5 Vergleich der UV-Spektren und Photoaktivierbarkeit	80
3.4.6 Darstellung der cAMP-CC	83
3.4.7 Vergleichendes Capturen.....	84
3.4.8 Zusammenfassung	85
3.5 Verwendung von Photo-Aminosäuren als Reaktivitätsfunktion	86
3.5.1 Scaffoldsynthese.....	86
3.5.2 Untersuchung der UV-lichtinduzierten Aktivierung des Diazirins	88
3.5.3 Synthese der Capture Compounds.....	91
3.5.4 Vergleichendes Capturen.....	91
3.5.5 Zusammenfassung	92
3.6 Clickfähige Scaffolds & Capture Compounds	93
3.6.1 Synthese von clickfähigen Capture Compounds.....	94
3.6.2 Optimierung der Click-Reaktion	95
3.6.3 Neuer photospaltbarer Azid-Biotin-Linker	101
3.6.4 Synthese von zellgängigen Scaffolds und Capture Compounds ..	107
3.6.5 Zusammenfassung	113
4 Experimenteller Teil	115

4.1	Verwendete Geräte, Arbeitstechniken und Reagenzien	115
4.2	Capture Experimente & nachfolgend Biochemische Analysen	118
4.2.1	Das On-Bead-Capture-Experiment	118
4.2.1	Probenvorbereitung und biochemische Analysen	118
4.3	Synthese.....	120
4.3.1	Fluorestierende Scaffolds & Capture Compounds	120
4.3.2	<i>o</i> - und <i>m</i> -Azido bzw. <i>m,m</i> -Bisazido-Scaffold & CCs	136
4.3.3	Spaltbare Reaktivitätsfunktionen.....	143
4.3.4	Amin-Scaffolds & Capture Compounds	150
4.3.5	Photo-Aminosäure-Scaffolds	165
4.3.6	Synthese eines clickfähigen Scaffolds & Capture Compound	169
4.3.7	Synthese eines photospaltbaren Biotin-Azid-Linkers	170
4.3.8	Synthese von zellgängigen Scaffolds & Capture Compounds	174
5	Literaturverzeichnis.....	183

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel eines 2d-Gelbildes aus einem E.coli-Zelllysat.....	2
Abbildung 2: Struktureller Vergleich von Affinitäts.- Photoaffinitäts- und Capture Compounds.....	3
Abbildung 3: Grundstruktur aller Capture Compounds.....	7
Abbildung 4: Strukturen der unnatürlichen Aminosäuren L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin und ihrer natürlichen Vorbilder.....	12
Abbildung 5: Struktur des cyclischen Adenosylmonophosphates	14
Abbildung 6: Struktur Vorinostat	15
Abbildung 7: Biotin + notwendiger Linker.....	16
Abbildung 8: Struktur der bisher verwendeten Capture Compounds	17
Abbildung 9: Unspezifischer Hintergrund in E.coli - bzw. HepG2-Lysat	18
Abbildung 10: Strukturelle Übersicht getesteter Rhodamin- und Fluoresceinfarbstoffe.....	27
Abbildung 11: Photostabilität getesteter Rhodamin- und Fluoresceinfarbstoffe	27
Abbildung 12: Strukturelle Übersicht getesteter Pyridiniumcumarine	28
Abbildung 13: Photostabilität getesteter Pyridiniumcumarine	28
Abbildung 14: Strukturelle Übersicht getesteter Cyanine und Hemicyanine	29
Abbildung 15: Photostabilität getesteter Cyanine und Hemicyanine.....	29
Abbildung 16: Emissionsmaximum der Blauen Diode im Vergleich zum Absorptionsmaximum des Fluoresceins.....	36

Abbildung 17: Vergleich der UV-Spuren der Abblitzprodukte von Scaffold 24 unter verschiedenen Bedingungen.....	37
Abbildung 18: Abhängigkeit der Azidaktivierung von der Linkerlänge und dem Azid	41
Abbildung 19: Bestimmung der Kapazität von anti-Fluorescein-Antikörper beschichteten Magnetbead	43
Abbildung 20: Selektive Fluoreszenzmarkierung von SAH-bindenden Proteinen in <i>E.coli</i>	44
Abbildung 21: Vergleich Laseremission und TAMRA-Absorption.....	46
Abbildung 22: Reaktivitätsfunktion im <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Azido- bzw. <i>m,m</i> -Bisazido-Scaffold	49
Abbildung 23: UV-Spektren vom <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Azido- bzw. <i>m,m</i> -Bisazid-Scaffolds.....	50
Abbildung 24: Abblitzstudie <i>p</i> -Azido-Scaffold	51
Abbildung 25: Abblitzstudie <i>m</i> -Azido-Scaffold.....	52
Abbildung 26: Abblitzstudie <i>o</i> -Azido-Scaffold	54
Abbildung 27: Abblitzstudie <i>m,m</i> -Bisazido-Scaffold	55
Abbildung 28: Capture-Ergebnisse mit <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Azido-cAMP-Capture Compounds	57
Abbildung 29: Capture-Ergebnis mit <i>m,m</i> -Bisazido-cAMP-Capture Compound	58
Abbildung 30: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound.....	64
Abbildung 31: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound.....	65
Abbildung 32: Abblitzstudie Azido-Azo-Scaffold	68
Abbildung 33: Abblitzstudie Tetrafluorazido-Azo-Scaffold	69
Abbildung 34: Nachweis des Spaltungsproduktes 91	71
Abbildung 35: Unterschiedliche Abstände in Amin-Scaffolds	72

Abbildung 36: Struktureller Vergleich der dargestellten Amin-Scaffolds.....	80
Abbildung 37: Vergleich der UV-Spektren dargestellter Amin-Scaffolds	81
Abbildung 38: Abblitzstudie Amin Scaffold mit 1,3-Abstand	81
Abbildung 39: Capture-Ergebnisse der Amin-CCs mit 1,3- 1,4- u. 1,6-Abstand	84
Abbildung 40: Photo-Aminosäuren in Scaffolds	86
Abbildung 41: Abblitzstudie Photo-Leucin-Scaffold.....	88
Abbildung 42: Beispiel der Reaktionskontrolle einer Click-Reaktion mittels HPLC-MS	96
Abbildung 43: UV-Chromatogramm (254 nm) der Photolyseprodukte.....	103
Abbildung 44: Nachweis des Photolyseproduktes mittels HPLC-MS.....	106
Abbildung 45: NMR-Spektrum zur Reaktionskontrolle der Veresterung.....	111

Schemenverzeichnis

Schema 1: Darstellung eines typischen Capture-Experimentes	5
Schema 2: Übersicht photoreaktiver Gruppen in der Biochemie und ihrer unmittelbaren, hochreaktiven Photolyseprodukte	9
Schema 3: Photoinduzierter Abbau von Phenylaziden - Teil 1	10
Schema 4: Photoinduzierter Abbau von Phenylaziden - Teil 2	11
Schema 5 Biologische Methylierung und Bildung von <i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein	13
Schema 6: Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgtem Capturen - Teil 1	18
Schema 7 Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgten Capturen - Teil 2	19
Schema 8: Nachteil bei der Spaltung hinter der Reaktivitätsfunktion bei zu hohen Bindungsstärken von Zielproteinen	19
Schema 9: Thermisch induzierte 1,3-Dipolare Cycloaddition	20
Schema 10: Cu(I)-katalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition.....	21
Schema 11: Überblick wichtiger Strukturmerkmale zukünftiger Scaffolds	24
Schema 12: Synthese der Fluorescein Modellverbindung 17	25
Schema 13: Synthese der TAMRA Modellverbindung 18	26
Schema 14: Synthese von Fluorescein-Scaffolds.....	32
Schema 15: Synthese von geschützten SAH-Capture Compounds	34
Schema 16: Entschützung von SAH-Capture Compounds	35
Schema 17: Synthese der Modellverbindungen mit Hydrazin bzw. Ethylendiamin-Linker	39

Schema 18: Synthese der Modellverbindungen mit unterschiedlichen Aziden	40
Schema 19: Synthese eines acetylierten Fluorescein-Derivates	41
Schema 20: Synthese der Rhodamin Scaffolds	45
Schema 21: Synthese der Rhodamin SAH Capture Compound	46
Schema 22: Synthese der <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Azido- bzw. <i>m,m</i> -Bisazido-Scaffolds	48
Schema 23: Postulierte Photolyseprodukte des <i>m</i> -Azido-Scaffolds	53
Schema 24: Synthese der cAMP-Capture Compounds	56
Schema 25: Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgtem Capturen	60
Schema 26: Nasschemisch spaltbare Gruppen & Spaltungsprodukte	61
Schema 27: Synthese von Azo-Aminosäuren	61
Schema 28: Synthese spaltbarer aromatischer Azoazide	62
Schema 29: Scaffoldsynthese mit einer spaltbaren Reaktivitätsfunktion	62
Schema 30: Spaltungsuntersuchungen mit Natriumdithionit	63
Schema 31: Synthese einer cAMP-CC mit einer spaltbaren Reaktivitätsfunktion	64
Schema 32: Synthese von perfluorierten aromatischen Aziden	66
Schema 33: Darstellung der Terafluorazido-Azobenzoesäure	66
Schema 34: Synthese von Scaffolds mit spaltbaren Reaktivitätsfunktionen	67
Schema 35: Spaltung der Azo-Scaffolds 89 und 90	70
Schema 36: Stickstoff vs. Kohlenstoff als zentraler Baustein im Scaffold	72
Schema 37: Retrosynthetische Analyse der Biotin-Linker	73

Schema 38: Umsetzung von Biotin-NHS mit PEG-Linker, β -Alanin- <i>tert</i> -Butylester Hydrochlorid	73
Schema 39: Umsetzung mit Boc-geschütztem Ethylendiamin bzw. β -Alanin- <i>tert</i> -Butylester Hydrochlorid	74
Schema 40: Synthese des zentralen Strukturelements in Scaffold mit 1,3-Abstand.....	75
Schema 41: Synthese des Scaffolds mit 1,3-Abstand - Weg A	75
Schema 42: Nebenreaktion zum postulierten Cyclisierungsprodukt	76
Schema 43: Synthese des Scaffolds mit 1,3-Abstand - Weg B	76
Schema 44: Darstellung des Scaffoldes-Ethylester mit 1,4-Abstand.....	77
Schema 45: Darstellung des Scaffoldes mit 1,6-Abstand	78
Schema 46: Postulierte Photolyseprodukte vom Amin-Scaffold mit 1,3-Abstand	82
Schema 47: Darstellung der cAMP-CCs.....	83
Schema 48: Darstellung des Thiolo-carbamates über 2 Wege	87
Schema 49: Synthese der Photo-Aminosäure-Scaffolds	87
Schema 50: Photolyse von Scaffold 127 und mögliche Folgeprodukte.....	89
Schema 51: Synthese von cAMP-Capture-Compounds.....	91
Schema 52: Schematische Darstellung eines Click-CC-Experimentes.....	93
Schema 53: Synthese eines Clickfähigen Scaffolds & Capture Compound	94
Schema 54: Umsetzung einer clickfähigen cAMP Capture Compound mit einem Azid.....	95
Schema 55: Photolytische Spaltung des Scaffolds nach erfolgtem Capturen	101
Schema 56: UV-lichtinduzierte Spaltung von <i>o</i> -Nitrobenzyl-derivate.....	101

Schema 57: Darstellung eines photospaltbaren Azid-Linkers - Teil 1	102
Schema 58: Darstellung eines photospaltbaren Azid-Linkers - Teil 2	103
Schema 59: Postulierte Photolyseprodukte des photospaltbaren Linkers bei 350 nm	104
Schema 60: Click & Cleave Konzept - chemischer Hintergrund.....	105
Schema 61: Click & Cleave Konzept - praktische Durchführung	106
Schema 62: Potentielle Anwendungen von zellgängigen Capture Compounds	107
Schema 63: Darstellung eines Click-Scaffold-Amides.....	107
Schema 64: Darstellung einer SAHA-Click-CC	108
Schema 65: Untersuchte Reaktionswege für die Einführung einer Alkin-Funktion.....	109
Schema 66: Darstellung eines „Mini“-Scaffolds mittels Acylierung.....	110
Schema 67: Darstellung eines „Mini“-Scaffold-Amides samt „Mini“-SAHA-CC.....	110
Schema 68: Veresterung & Alkylierung von L-Photo-Leucin bzw. –Methionin	111
Schema 69: Darstellung einer „Mini“-SAHA-CC	112
Schema 70: Boc-Schützung des Photo-Leucin-Scaffolds	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss auf die Photoreaktivität von 24	37
Tabelle 2: Abblitzprodukte von 24 unter verschiedenen Bedingungen.....	38
Tabelle 3: Einfluss der Azidposition auf das Captureverhalten von cAMP-Verbindungen in <i>E.coli</i>	58
Tabelle 4: Capture-Ergebnisse mit <i>m,m</i> -Bisazido cAMP-Capture Compound.....	58
Tabelle 5: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound	65
Tabelle 6: Capture-Ergebnisse der Amin-CCs mit 1,3- 1,4- u. 1,6-Abstand.....	84
Tabelle 7: Abblitzprodukte von 127 nach Bestrahlung bei 350 nm	89
Tabelle 8: Vergleich des Captureverhaltens von cAMP-Photo-Aminosäure-CC vs. Kit-CC in Hep-G2	92
Tabelle 9: Untersuchte Click-Bedingungen - Voruntersuchungen	97
Tabelle 10: Click-Bedingungen - Temperatur, Zeit, Kupferkonzentration	97
Tabelle 11: Click-Bedingungen - Cu(II) vs. Cu(I)	98
Tabelle 12: Click-Bedingungen - Ligand	99
Tabelle 13: Click-Bedingungen - biochemische Zusätze	100
Tabelle 14: Detektierte Spaltungsprodukte	104

Abkürzungsverzeichnis

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ac	Acetyl
Äquiv.	Äquivalent
arom.	aromatisch
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	englisch: <i>Bovines serum albumin</i>
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cap	englisch: <i>catabolite gene activator</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CC	englisch: <i>Capture Compound</i>
CCMS	englisch: <i>Capture Compound Mass Spectrometry</i>
CH	Cyclohexan
CP	Capture Puffer
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig's Base
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
Eintr.	Eintrag

ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gef.	gefunden
GG	Gleichgewicht
HATU	O-(7-Aza-1-benzotriazolyl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hep-G2	Hepathozyt G2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	englisch: <i>high performance liquid chromatography</i>
IC	englisch: <i>inhibition concentration</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Int.	Intensität
ISC	englisch: intersystem crossin
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
LC-MS	englisch: <i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>
LCT	englisch: <i>liquid chromatography - TOF</i>
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lsg.	Lösung
Lsm.	Lösemittel
m	Multiplett
Me	Methyl
MPLC	englisch: <i>medium pressure liquid chromatography</i>
MW	englisch: <i>molecular weight</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	englisch: <i>nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PBS	englisch: <i>Phosphor bufferes salin</i>
PEG	Polyethylenglykol
PF	englisch: <i>Pullout function</i>

Ph	Phenyl
PKA-R1	Proteinkinase A - regulatorische Untereinheit 1
ppm	englisch: <i>parts per million</i>
ⁱ Pr	Isopropyl
q	Quartett
quant.	quantitativ
quint	Quintett
R _F	Retentionsfaktor
R _T	Retentionszeit
R,R'	Rest(e)
rel	relativ
RF	Reaktivitätsfunktion
Rot.	Rotamere
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
SAHA	englisch: <i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SDS	englisch: <i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SF	Selektivitätsfunktion
Subs.	Substrat
t	Tripplett
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TBS-T	englisch: <i>Tris-Buffer saline - tween 20</i>
TFA	englisch: <i>Trifluoro acetic acid</i>
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TOF	englisch: <i>time of flight</i>
TPTA	Tris-((1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)-amin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
UP	unspezifisches Protein

UV	ultraviolett
vs	latein: <i>versus</i>
ZA	Zentralatom
ZIM	zentrale Initiative Mittelstand
ZP	Zielprotein

1 Einleitung

1.1 Proteomics - Von der 2D-Gelelektrophorese bis zur CCMS-Technologie

Der Begriff Proteom wurde 1994 von Mark Wilkins geprägt und beinhaltet die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen (Zelle, Gewebe und Kompartiment) unter exakt definierten und vergleichbaren Bedingungen^[1]. Die Analyse dieses Proteoms ist das Aufgabenfeld der stark wachsenden, in Anlehnung an die mit dem Suffix *-omics* bezeichneten modernen Teilgebiete der Biologie, Proteomics. Für eine umfassende Analyse ist es sehr wichtig, die Proteine einer ganzen Zelle oder sogar eines kompletten Gewebeteils zu identifizieren und diese dann eventuell noch mit denen einer pathologischen Probe zu vergleichen. Die sich daraus ergebenden Unterschiede können Aufschluss über Wirkung und Nebenwirkung von Medikamenten oder krankheitsverursachende inter- und intrazelluläre Veränderungen geben^[1].

Eine wichtige Trennmethode in der Proteomics ist die 1974 von Klose und O'Farrell unabhängig voneinander entwickelte 2D-Gelelektrophorese^[2, 3]. Diese kombiniert zwei Trennsysteme, die auf unterschiedliche physikalische Eigenschaften beruhen. Einerseits die isoelektrische Fokussierung (IEF) und andererseits die SDS-Gelelektrophorese (SDSPAGE). Dabei werden in einem ersten Schritt die Proteine durch die isoelektrische Fokussierung mittels eines pH-Gradienten nach ihrer Ladung getrennt. Im darauf folgenden Schritt erfolgt die weitere Auftrennung in der 2. Dimension nach dem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE. Die Anfärbung der Proteine erfolgt mit Coomassie- oder Silberfärbung oder durch Fluoreszenzdetektion. Anschließend kann man durch ein Übereinanderlegen der erhaltenen zweidimensionalen Punktmuster (Abbildung 1) verschiedener Proben (z.B. gesunde und pathologische Probe) eventuell schon Unterschiede analysieren^[1].

Eine eindeutige Identifizierung der Proteine ist dadurch jedoch nicht möglich. Sie kann erst durch Ausschneiden der einzelnen Spots, tryptischer Fragmentierung der Proteine und

massenspektrometrischer Analyse der erhaltenen Peptide erfolgen. Die dabei erhaltenen Massenspektren müssen in einem nächsten Schritt mit Proteindatenbanken der jeweiligen Spezies

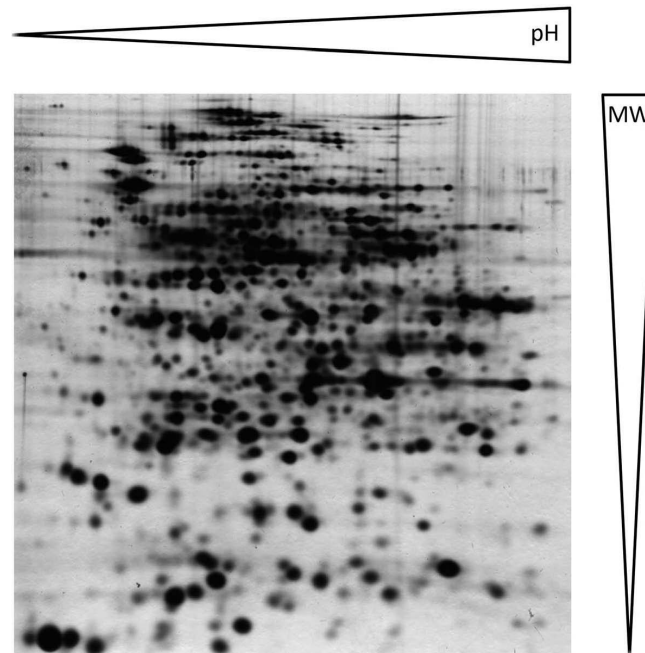


Abbildung 1: Beispiel eines 2d-Gelbildes aus einem E.coli-Zelllysat

abgeglichen werden, um die Proteine zu identifizieren. Trotz sehr sensibler Färbemethoden sind manche Proteine nicht detektierbar. Der Grund hierfür kann einmal sein, dass sich diese Proteine in den für die Gelelektrophorese verwendeten Pufferlösungen nicht lösen (z.B. hydrophobe Membranproteine) oder sie kommen in dem untersuchten Gewebe nur in sehr geringen Mengen vor. Ein weiterer Nachteil ist, dass man mit Hilfe der Gelelektrophorese nicht ohne weiteres in der Lage ist, selektive Interaktionspartner von Proteinen bzw. Liganden zu identifizieren.

Eine Möglichkeit für die Analyse solcher selektiven Interaktionspartner ist die Affinitätschromatographie. Dabei wird der gewünschte Ligand oder auch ein Protein selbst (Selektivitätsfunktion) an einen polymeren Träger gebunden, welcher dann als feste Phase bei der Chromatographie dient^[4]. Damit ist man in der Lage, niedrig abundante Proteine anzu- bzw. hoch abundante abzureichern. Jedoch können bei sehr großen Proteinen sterische Wechselwirkungen überwiegen, die sich störend auf die Ligand-Protein- bzw. Protein-Protein-Interaktion auswirken. Auch können Proteine mit einer sehr hohen Bindungsaffinität, selbst bei der Verwendung von einem Überschuss des freien Liganden zur Verdrängung, nicht immer von der festen Phase eluiert werden. Sie sind somit auch nicht identifizierbar. Diese Nachteile können durch die Verwendung des freien Moleküls (Affinitätssonde, Abbildung 2)

vermieden werden. Die Affinitätssonde ist nicht an einem polymeren Träger gebunden, sondern besitzt neben der Selektivitätsfunktion eine Sortierfunktion (Pullout Funktion, oft Biotin). Somit kann sie in Lösung zum Zelllysate gegeben werden. Die anschließende Isolierung erfolgt mit Magnet- oder Agarose-Beads, die mit Streptavidin beschichtet sind. Durch die hohe Bindungsaffinität von $4 \cdot 10^{-14} \text{M}^{[5]}$ zwischen freiem Biotin und Streptavidin, können die biotintragenden Sonden sehr leicht aus dem Zelllysate entfernt werden. Sterische Wechselwirkungen werden so reduziert. Binden die Zielproteine so stark, dass sie nicht mehr von den Beads herunter gewaschen werden können, können diese auf den Beads tryptisch fragmentiert werden oder die Biotin-Streptavidin-Bindung wird unter definierten Bedingungen wieder gespalten^[5]. Durch eine alternative Pullout Funktion (z.B. mittels der Click-Chemie) und/oder einer Möglichkeit der selektiven Spaltung dieser Affinitätssonden werden diese immer weiter verbessert, wodurch ein breites biochemisches Anwendungsspektrum erreicht wird^[6]. Ein wesentlicher Nachteil bleiben jedoch Zielproteine, die eine sehr schwache Bindungsaffinität zu dem verwendeten Liganden aufweisen, da sie schon bei schonenden Waschschritten wieder entfernt werden. Somit können diese bei beiden Anwendungen der Affinitätssonden nicht beobachtet werden.

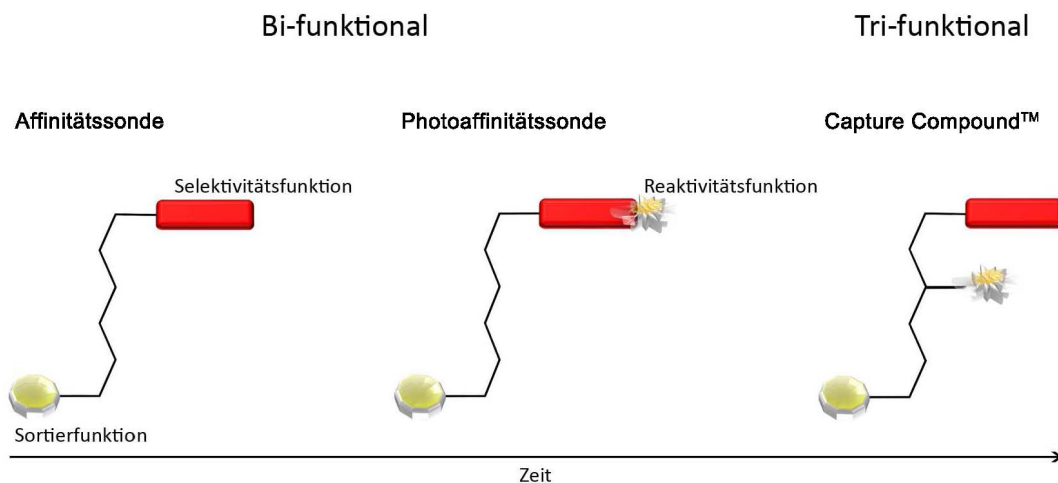


Abbildung 2: Struktureller Vergleich von Affinitäts-, Photoaffinitätssonden und Capture Compounds

Um solche, zu dem Liganden schwach bindenden Zielproteine, der Analyse zugänglich zu machen, müssen die Proteine noch zusätzlich mit der Affinitätssonde geknüpft werden. Eine Möglichkeit bieten modifizierte Photoaffinitätssonden (Abbildung 2). Der prinzipielle Aufbau ist identisch mit dem der Affinitätssonden, jedoch wurde bei den Photoaffinitätssonden die Selektivitätsfunktion chemisch so verändert, dass es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung innerhalb des aktiven Zentrums des Zielproteins kommt^[7]. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Reaktivitätsfunktion wird das dynamische Gleichgewicht, das immer zwischen Proteinen und ihren Interaktionspartnern herrscht, „eingefroren“. Die anschließende Isolierung kann ähnlich

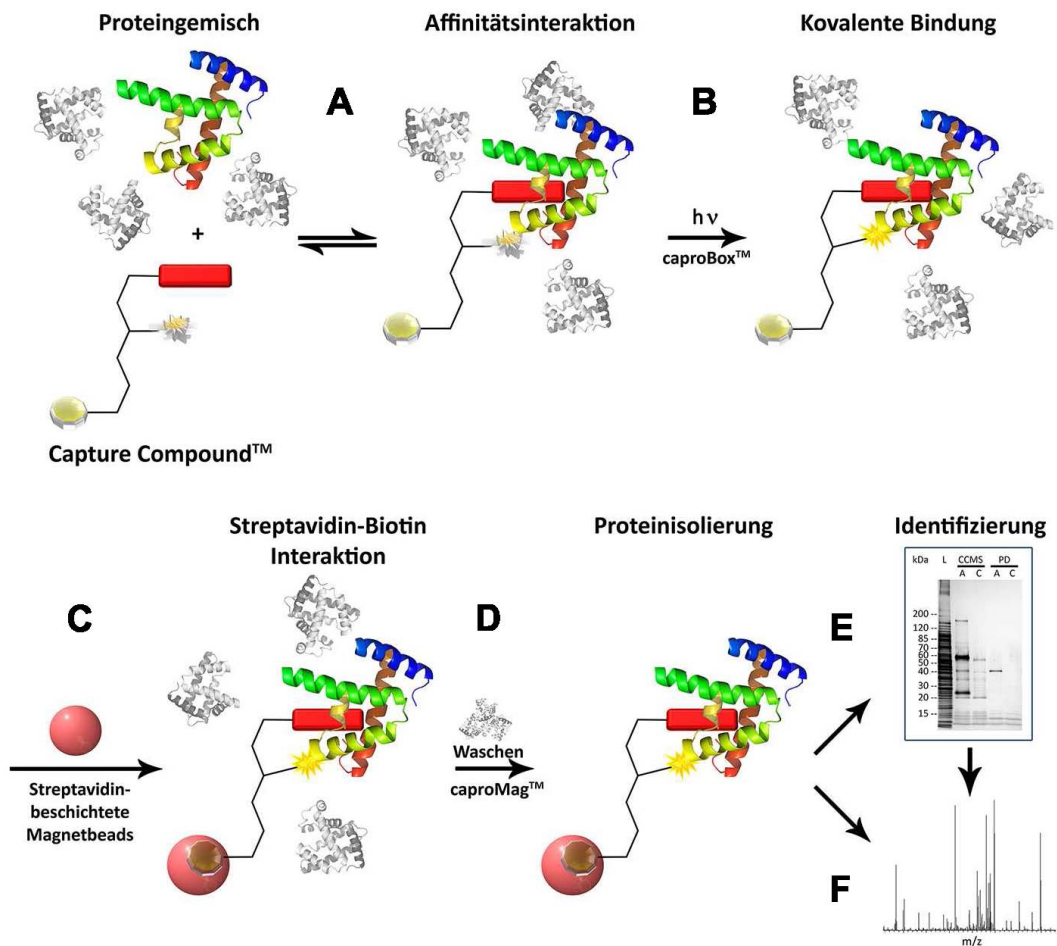
zu den beschriebenen Affinitätssonden wieder mittels Streptavidin-Beads erfolgen oder es wird auf diese Art eine Markierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff vorgenommen^[8, 9].

Ein gravierender Nachteil ist die Tatsache, dass sich viele Selektivitätsfunktionen chemisch gar nicht so modifizieren lassen, dass sie a) weiter vom Protein spezifisch erkannt werden und b) trotzdem in der Lage sind, im aktiven Zentrum eine kovalente Bindung zu knüpfen. Eine solche Modifikation der Selektivitätsfunktion kann weiter dazu führen, dass neben dem Verlust der Aktivität dem Zielprotein gegenüber, sterische Wechselwirkungen eine erfolgreiche Ligand-Protein-Wechselwirkung verhindern. Gelingt aber eine solche Modifikation, ist jedoch fast immer nur eine Position im Molekül für die Verknüpfung mit der restlichen Photoaffinitätssonde verwendbar. Da die Position der Anbindung des Liganden aus sterischen Gründen nicht für das aktive Zentrum des Proteins zur Verfügung steht, wäre man in der Lage zu untersuchen, ob und mit welchem Strukturelement ein Ligand unterschiedliche Proteine adressiert. Diese Fragestellung ist insbesondere bei der Entwicklung von neuen Medikamenten essentiell.

Diese Einschränkungen besitzt die von der caprotec bioanalytics GmbH entwickelte Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS)-Technologie nicht. Hierbei werden erstmals trifunktionale Moleküle zur Analyse des Proteoms eingesetzt, wobei die Reaktivitätsfunktion unabhängig von der Selektivitätsfunktion ist^[10]. Diese synthetisch hergestellten Moleküle, im weiteren Capture CompoundsTM genannt (Abbildung 2), bilden den Kern der CCMS-Technologie. Durch sie ist die affinitäts-basierte Isolierung von schwach bindenden, sehr großen, schwach affinen und niedrig abundanten Proteinen aus komplexen Zelllysaten möglich. Dies führt dazu, dass das komplexe Proteingemisch auf die wesentliche Bestandteile reduziert und das Zielprotein angereichert wird.

1.2 Das Capture Experiment

Bei einem Capture-Experiment wird eine gepufferte Lösung der Capture Compound zu dem zu untersuchenden komplexen Zelllysate einer Gewebeprobe gegeben. Zur Einstellung des dynamischen Gleichgewichtes wird die Probe anschließend bei 4 °C, Raumtemperatur oder 37 °C, je nach biochemischer Fragestellung, inkubiert (Schema 1, Schritt **A**). Um das Gleichgewicht „einfrieren“ zu können, folgt die Aktivierung der Reaktivitätsfunktion, welche eine photolabile Gruppe ist, die mittels UV-Licht mit $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ bzw. 350 nm aktiviert wird. Das daraufhin entstehende reaktive und instabile Intermediat reagiert mit den Verbindungen ab, die sich in unmittelbarer Nähe befinden.



Schema 1: Darstellung eines typischen Capture-Experimentes

Durch das Gleichgewicht zwischen Zielprotein und Selektivitätsfunktion ist die Konzentration dieses Zielproteins (Schema 1, farbiges Protein) in unmittelbarer Nähe der aktivierten Reaktivitätsfunktion sehr hoch. Es kommt zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen Capture Compound und Zielprotein (Schema 1, Schritt **B**). Um diese Bestrahlung

immer unter identischen und kontrollierten Bedingungen durchführen zu können, wurde eigens dafür die caproBoxTM entwickelt. Sie garantiert eine Bestrahlung unter konstanten Bedingungen bei gleichzeitiger Kühlung auf 1 – 4 °C. Diese Kühlung ist äußerst wichtig, da es ohne sie zu einer starken Erwärmung der biologischen Probe kommt, was zu ihrer Schädigung führen könnte. Nach erfolgter Bildung der kovalenten Bindung werden Streptavidin beschichtete Magnetbeads in die Probe gegeben (Schema 1, Schritt **C**). Durch die hohe Bindungsaffinität zwischen Biotin und Streptavidin kommt es zur Anlagerung aller biotinylierter Substanzen an die Magnetpartikel, die mit Hilfe des ebenfalls eigens dafür entwickelten caproMagsTM aus der Probe entfernt und anschließend mehrmals mit Puffer, Wasser und einem Wasser-Acetonitril Gemisch gewaschen werden (Schema 1, Schritt **D**). Je nach Wunsch kann die anschließende Analyse per SDS-PAGE (Schritt **E**, Schema 1) und/oder mittels Massenspektrometrie (Schritt **F**, Schema 1) erfolgen.

Die massenspektrometrische Charakterisierung der isolierten Proteine erfolgt anschließend durch die Kombination von tryptischer Fragmentierung und LC-MSⁿ. Dabei macht man sich zu Nutze, dass das Enzym Trypsin spezifisch C-terminal hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. Somit entsteht ein charakteristischer Peptidmix, der chromatographisch getrennt und mittels MSⁿ sequenziert werden kann. Die so bestimmten Peptidfragmente können dann mit der Sequenz bekannter Proteine verglichen werden, sofern diese, bzw. die sie kodierenden DNA-Sequenzen in einer Datenbank erfasst sind.

1.3 Capture Compounds und ihre Anwendung

Die für das Capturen von Proteinen verwendeten Capture Compounds besitzen alle eine identische Grundstruktur, das Scaffold (Abbildung 3). Unterschiede innerhalb der Scaffolds treten nur bei der Verwendung von verschiedenen Reaktivitätsfunktionen (RF) auf. Diese sind über den dreiarmligen Kern des Scaffolds (Asparaginsäure) mit der Selektivitätsfunktion (SF) und dem Biotin als Sortierfunktion (Pullout-Funktion) verbunden.

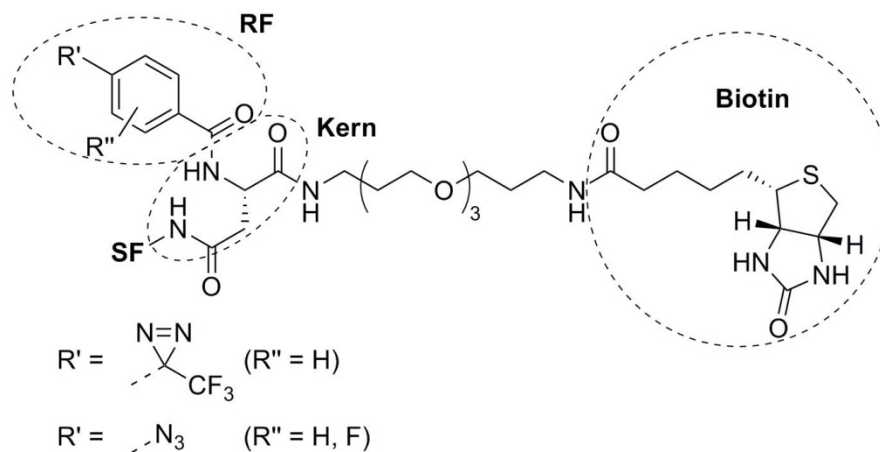


Abbildung 3: Grundstruktur aller Capture Compounds

Über die Carbonsäureseitenkette der Asparaginsäure kann z.B. über ein Amid eine beliebige Selektivitätsfunktion an das Scaffold angebunden werden. Dies ermöglicht die Synthese von mehreren Capture Compounds, in denen ein und dieselbe Selektivitätsfunktion unabhängig von der Reaktivitätsfunktion, über verschiedene Anbindungsstellen an das Scaffold gebunden ist^[11, 12, 13]. Dieses Kleinmolekül kann ein Cofaktor oder ein Botenstoff wie auch ein pharmakologisch wirksames Kleinmolekül sein, das sich noch in ersten präklinischen Studien befindet. Über die verschiedenen Anbindungsstellen der Selektivitätsfunktionen können unterschiedliche Proteine selektiv adressiert werden, was eine Identifizierung von „Off-Targets“ ermöglicht. Als solche werden Proteine bezeichnet, die zwar spezifisch das Kleinmolekül binden, dadurch jedoch Nebenwirkungen verursachen. Dadurch versetzt einen die CCMS-Technologie schon frühzeitig in die Lage, auftretende Nebenwirkungen von neuen Medikamenten zu erfassen.

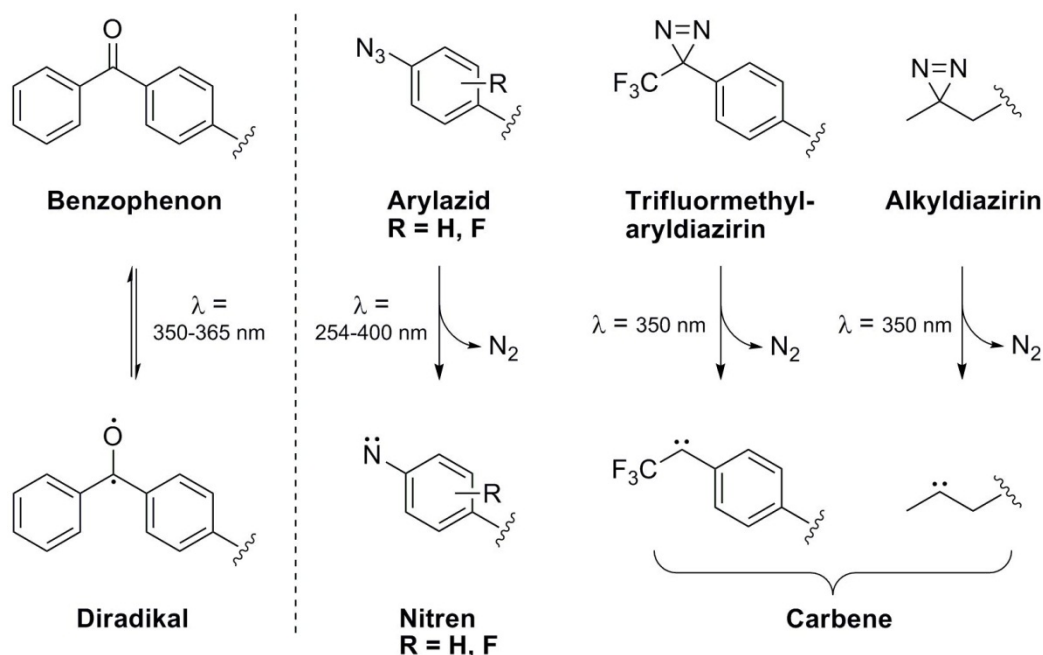
1.4 Photolabile Gruppen in biochemischen Systemen

Um Proteine und deren Funktion besser verstehen und untersuchen zu können, wird seit seiner ersten Anwendung vor knapp 50 Jahren^[14] das photoinduzierte Labeling in biochemischen Systemen immer weiter optimiert. Um in einem biochemischen Experiment erfolgreich kovalente Bindungen zwischen einem Kleinmolekül und Proteinen oder sogar zwischen ganzen Zellen mittels einer photochemischen Reaktion zu knüpfen, müssen einige wichtige Bedingungen erfüllt sein. Zum einen darf die photolabile Gruppe nicht zu groß und sperrig sein, da sie dadurch die zu untersuchenden Ligand-Protein oder auch Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen könnte. Die erhaltenen Ergebnisse wären dadurch nur noch bedingt aussagekräftig. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, muss diese funktionelle Gruppe inert gegenüber allen in Zellen und anderen Proteingemischen vorkommenden, funktionellen Gruppen sein. Des Weiteren darf bei der gezielten Aktivierung mittels Bestrahlung durch UV-Licht die verwendete Aktivierungswellenlänge nicht zu kurzweilig sein, da einerseits das Zell- bzw. Proteinmaterial durch zu harte UV-Strahlung geschädigt werden kann^[15] und andererseits Innerfiltereffekte auftreten. Eine Aktivierungswellenlänge von > 300 nm ist wünschenswert. Wurde zu Beginn nur eine Diazogruppe als photoaktivierbare funktionelle Gruppe verwendet^[14], stehen der Biochemie heute mehrere verschiedene photolabile Gruppen zur Verfügung, die die erforderlichen Bedingungen ausreichend erfüllen. Diese teilen sich, basierend auf ihrer reaktiven Spezies, in vier Gruppen^[16]:

- Nitrene (generiert aus: Phenyl-, Purin-, Pyrimidin-, Acyl- und Alkylazide)
- Carbene (generiert aus: Diazirine, Diazogruppen)
- Radikale (generiert aus: Benzophenone, Enone), Schwefelradikale
- Kohlenstoff-Elektrophile (Nitrobenzole, Diazonium Salze, Schwefel-, Stickstoff- und Phosphor-Kationen)

Kohlenstoff-Elektrophile haben sich dabei nicht annähernd so stark etabliert wie Radikale, Nitren- oder Carbenvorstufen. Von diesen drei möglichen, photoaktivierbaren Verbindungen haben sich in den letzten Jahren vier wesentliche Verbindungen (und ihre substituierten Derivate) für die Verwendung in biochemischen Systemen etabliert (Schema 2)^[15]. Sie erfüllen die gestellten Bedingungen an Photoreaktivität, Größe und sonstigen inertem Verhalten Proteinen gegenüber am besten. Benzophenon und substituierte Derivate des Benzphenons besitzen eine Sonderstellung unter den dargestellten Verbindungen. Wie gezeigt

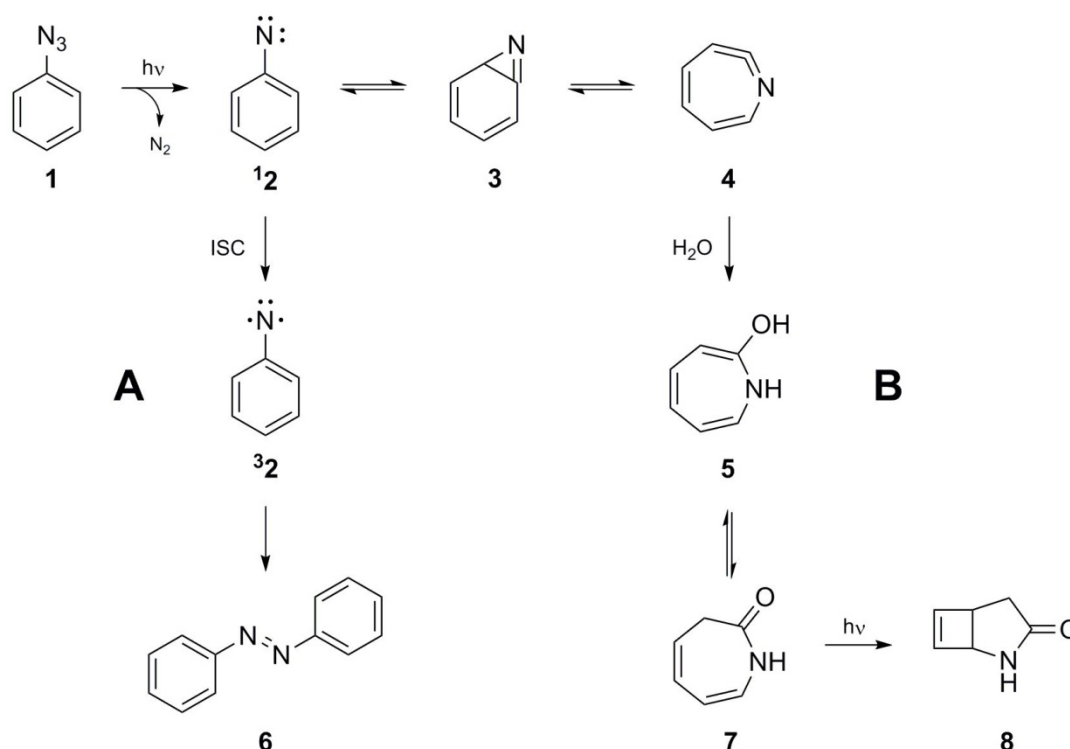
erfolgt die Anregung mit einer relativ langen Wellenlänge von 350 – 365 nm. Bei der Aktivierung von Benzophenonen bildet sich ein Diradikal, welches in einem Gleichgewicht mit der inaktiven Form vorliegt. Das Benzophenondiradikal ist in der Lage mit C–H Bindungen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden, zu reagieren und dadurch eine kovalente Bindung zu knüpfen. Benzophenondiradikale besitzen typischerweise eine Lebensdauer von ca. 120 μ s. In dieser Zeit reagieren sie entweder mit einem geeigneten Reaktionspartner oder es bildet sich das nicht aktive Benzophenon zurück, welches wieder erneut aktiviert werden kann. Somit sind durch wiederholte Anregungen theoretisch höhere Ausbeuten an kovalentem Crosslink möglich^[15].



Schema 2: Übersicht photoreaktiver Gruppen in der Biochemie und ihrer unmittelbaren, hochreaktiven Photolyseprodukte

Die Verwendung von Arylaziden erfordert mit 254 – 400 nm eine teilweise energiereichere UV-Strahlung zu deren Aktivierung. Die höherwelligen Anregungswellenlängen von bis zu 400 nm können jedoch nur bei der Verwendung von substituierten Aromaten erreicht werden. Die Aktivierung erfolgt durch Bildung eines Nitrens in Folge der Abspaltung von Stickstoff. Die Lebenszeit eines solchen Nitrens ist mit bis zu 100 μ s nur etwas kürzer als die des Benzophenondiradikals. Nitrene sind zusätzlich zu der C–H Insertion, auch in der Lage in X–H Bindungen zu insertieren, was einen deutlich Vorteil bei der Verwendung in biochemischen Systemen darstellt^[15]. Ein Nachteil ist jedoch, dass Nitrene unter Ringerweiterung weiter reagieren (Schema 1.3) und die Folgeprodukte nur noch in der Lage sind, als Elektrophil mit Proteinen zu reagieren^[17, 18, 19]. Schema 1.3 zeigt die möglichen

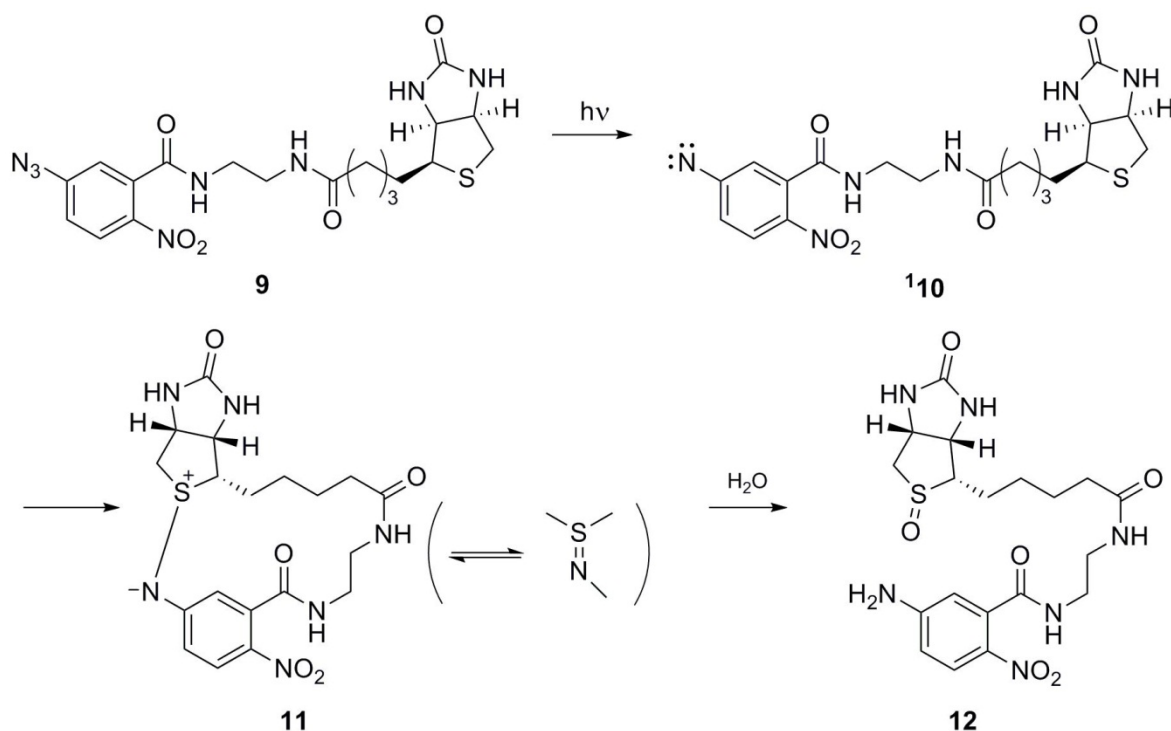
Reaktionswege des photoaktivierbaren Phenylazides **1**. Nach Aktivierung durch Bestrahlung und Abspaltung des Stickstoffes kommt es zur Bildung eines Singulett-Phenylnitrens **12**, das über zwei Wege weiter reagieren kann. Über den Weg **A** kommt es durch ein Intersystem Crossing (ISC) zur Bildung des Triplettzustandes des Nitrens **32**, das dadurch im Folgeschritt zu der Azoverbindung **6** weiterreagiert. Da dies jedoch nur unterhalb 180 K vermehrt auftritt, ist dieser Weg nur von untergeordneter Relevanz.



Schema 3: Photoinduzierter Abbau von Phenylaziden - Teil 1

Über den Weg **B** bildet sich aus dem Singulett-Nitren **12** in einer Gleichgewichtsreaktion über das Benzazirin **3** das Dehydroazepin **4**. Dieses kann in einer folgenden Additionsreaktion mit Elektrophilen, z.B. mit Wasser oder Proteinen, weiter reagieren. Das erhaltene Reaktionsprodukt **7** ist wiederum in der Lage, eine lichtinduzierte Umlagerung zu einem stabilen Bicyclus **8**inzugehen^[18, 19]. Diese eben aufgezeigten Nachteile werden zum Teil bei der Verwendung von Tetrafluorarylaziden wieder ausgeglichen. Bei Tetrafluorarylaziden ist die Ringerweiterung zum Teil unterdrückt, was zu einer Erhöhung der Ausbeute an kovalentem Crosslink führt^[20, 21]. Eine weitere lichtinduzierte Folgereaktion tritt bei der Verwendung von Arylaziden wie **9** auf, die über eine frei bewegliche Molekülkette mit Biotin verknüpft sind. Godovikova *et al.* haben gezeigt, dass das durch Bestrahlung gebildete Phenylnitren **10** über die frei bewegliche Kette mit dem Schwefel des Biotins intramolekular reagiert und ein semistabiles Iminosulfuran **11** liefert (Schema 4)^[22]. Es ist beschrieben, dass

der Cyclus **11** in neutraler wässriger Lösung innerhalb von 10 Tagen durch Wasser wieder geöffnet wird und sich das stabile Redoxprodukt **12** bildet.



Schema 4: Photoinduzierter Abbau von Phenylaziden - Teil 2

Die verwendeten Capture Compounds besitzen mit Biotin, das über eine freibewegliche Alkoxykette mit einem Phenylazid verknüpft ist, die gleichen wesentlichen Strukturmerkmale wie **9**. Dadurch ist die in Schema 4 gezeigte Folgereaktion des Phenylnitrens, neben denen in Schema 3 vorgestellten, eine weitere potentielle unerwünschte Nebenreaktion, die besonders bei den verwendeten Capture Compounds auftreten kann. Alkyl- wie auch Aryldiazirine benötigen mit einer Wellenlänge von 350 nm eine geringere Aktivierungsenergie als die meisten aromatischen Azide. Der Energieeintrag in die biologische Probe ist dadurch geringer. Ebenso wie bei den Arylaziden erfolgt die Aktivierung durch Abspaltung von Stickstoff, was jedoch die Bildung eines Carbens als reaktive Spezies zur Folge hat. Carbene sind ebenfalls in der Lage, genauso wie Nitrene, mit C–H und X–H Bindungen kovalent zu reagieren. Jedoch besitzen sie mit einer Lebensdauer, die im Nanosekundenbereich liegt^[15] nicht genügend Zeit um eine Ringinsertion, wie bei den Nitrenen ausführlich beschrieben, einzugehen. Die aus einer solchen Ringerweiterung möglichen Folgereaktionen und Produkte konnten bei der Verwendung von Diazirinen nicht beobachtet werden.

Alkyldiazirine^[23] im Besonderen haben noch den weiteren Vorteil, dass sie deutlich kleiner als die entsprechenden aromatischen Derivate sind. Durch die Alkylkette besitzen sie

allerdings auch einen systematischen Nachteil gegenüber aromatischen Diazirinen. Infolge der Carbenbildung kann es zu einem 1,2-Protonenshift kommen^[24], was die Ausbeute an kovalentem Crosslink verringert. Durch die Abwesenheit eines Aromaten besitzen aliphatische Diazirine eine sehr ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zu herkömmlichen aliphatischen Ketten, was bei der Anwendung der künstlichen Aminosäuren L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin ausgenutzt wird^[25]. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um künstlich synthetisierte Derivate der natürlichen Vorbilder L-Leucin und L-Methionin (Abbildung 4).

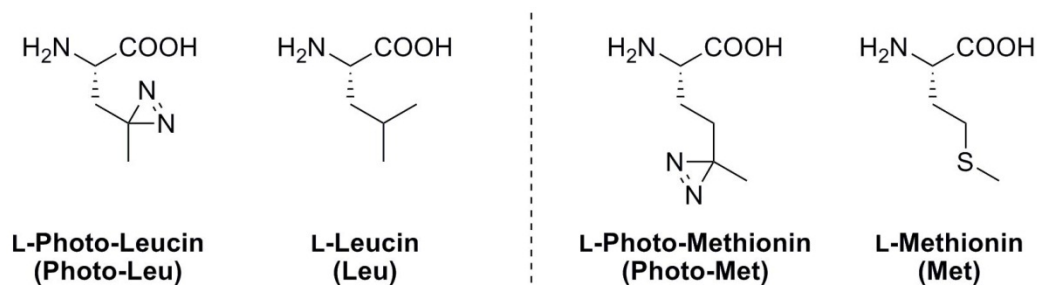


Abbildung 4: Strukturen der unnatürlichen Aminosäuren L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin und ihrer natürlichen Vorbilder

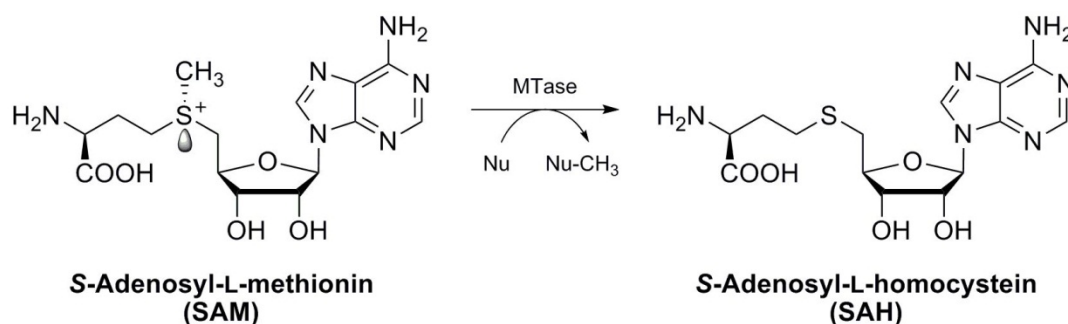
Durch das hohe Maß der strukturellen Übereinstimmung können diese künstlichen Aminosäuren während des Translationsschrittes der Proteinbiosynthese in der Zelle, gezielt in Proteine eingebaut werden. Durch diese elegante Art der Markierung von Proteinen mit einer photolabilen Gruppe, besteht die Möglichkeit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen zwei interagierenden Proteinen durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 350 nm „einzufrieren“. Die erhaltenen Protein-Protein-Komplexe, die durch mindestens eine kovalente Bindung zusammen gehalten werden, können mittels SDS-PAGE, Western Blot oder Massenspektrometrie analysiert werden^[26].

1.5 Verwendete Selektivitätsfunktionen

Die Selektivitätsfunktion ist der variabelste und vielseitigste Teil der Capture Compound. Als Selektivitätsfunktionen können Kleinmoleküle (z.B. Cofaktoren oder zelluläre Botenstoffe) verwendet werden, deren Zielproteine in verschiedensten Gewebearten vorkommen. Genauso ist aber auch eine Verwendung von pharmakologischen Wirkstoffen möglich, deren Zielproteine nur begrenzt in bestimmten oder nur in einer einzigen Gewebeart vorkommen. In dieser Arbeit wurden als Selektivitätsfunktion S-Adenosyl-L-homocystein, cyclisches Adenosinmonophosphat und das Krebsmedikament Vorinostat verwendet. Mit allen drei Verbindungen wurden bereits CCMS-Experimente durchgeführt^[11, 12, 27], was eine Bewertung der durch die neuartigen Capture Compounds erhaltenen Ergebnisse vereinfachte, da Erfahrungen und Ergebnissen mit identischen Selektivitätsfunktionen herangezogen werden konnten.

1.5.1 S-Adenosylhomocystein

S-Adenosyl-L-methionin (SAM) ist ein sehr vielseitiges Biomolekül, das in prokaryontischen sowie in eukaryontischen Zellen vorkommt. Neben Adenosintriphosphat (ATP) ist es einer der bedeutensten Cofaktoren, der in biologischen Reaktionen verschiedene chemische Gruppen bereitstellt. So ist SAM als Donor der 3-Amino-3-carboxypropyl-Gruppe an der Biosynthese des Antibiotikums Nocardizin A wie auch als Ausgangsstoff bei der Biosynthese des Pflanzenhormons Ethen beteiligt^[28].



Schema 5 Biologische Methylierung und Bildung von S-Adenosyl-L-homocystein

Die größte Bedeutung besitzt SAM jedoch als wichtigster Donor für Methylgruppen. Im Rahmen des 'Cyclus' der aktivierten Methylgruppe wird SAM enzymatisch durch den Transfer der Adenosylgruppe von ATP auf Methionin gebildet^[29]. Das dabei gebildete hochreaktive Stereozentrum ist von zentraler Bedeutung für den sich anschließenden Schritt,

die Methyltransferase-katalysierte Übertragung der Methylgruppe (Schema 5)^[28]. Nur SAM-Substrate, in denen der Schwefel *S*-konfiguriert ist, werden von den Enzymen erkannt. Der entsprechende *R*-konfigurierte Cofaktor wird nicht erkannt und inhibiert sogar einige Methyltransferasen (MTasen). Durch die Übertragung der Methylgruppe kommt es zur Bildung des stabileren *S*-Adenosyl-l-homocysteins (SAH) (Schema 5). Neben dieser erhöhten Stabilität weist SAH immer noch eine hohe Bindungsaffinität zu dem meisten Methyltransferasen auf. Dadurch eignet sich SAH im Gegensatz zu SAM hervorragend als Selektivitätsfunktion für das gezielte Adressieren und Isolieren von Methyltransferasen mit Hilfe von Capture Compounds^[12].

1.5.2 Cyclisches Adenosinmonophosphat

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Abbildung 5) ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff. Als intrazellulärer Botenstoff (Second Messenger) ist cAMP nicht wie SAM direkt an biochemischen Reaktionen beteiligt. Trotzdem beeinflusst es eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse. Sehr bedeutsam ist die Tatsache, dass dies in fast allen Fällen über die Aktivierung von nur einer Protein-Kinase erfolgt. Dieses Schlüsselenzym, die Protein-Kinase A (PKA) ist eine Serin-Threoninkinase und besteht aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Jede regulatorische Untereinheit für sich besitzt zwei Bindungsstellen für cAMP, die es unterschiedlich binden^[30, 29].

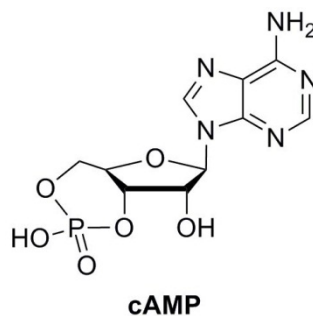


Abbildung 5: Struktur des cyclischen Adenosinmonophosphates

Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten kommt es zu einer Konformationsänderung des noch inaktiven Tetramers, infolge dessen die katalytischen Untereinheiten als enzymatisch aktive Monomere freigesetzt werden. Es kommt zur Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in verschiedensten Zielproteinen, was Einfluss auf deren Aktivität hat^[30, 29]. So ist cAMP über die Aktivierung der PKA wesentlich beteiligt an der Regulation:

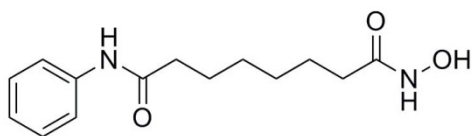
- des Stoffwechsels von Glykogen, Monosachariden und Lipiden^[29]

- der Hormonbiosynthese (z.B. Cholesterinesterase)^[30]
- der Aktivität von Ionenkanälen (z.B. Cl⁻ und Ca²⁺-Kanäle)^[30]
- der Transkription cAMP-abhängiger Gene (z.B. Phosphoenolpyruvat-Carboxylase)^[30]

Neben der PKA besitzt cAMP auch eine generelle Affinität zu vielen Kinasen. Da es zusätzlich auch eine ausreichende Stabilität besitzt, eignet es sich hervorragend für die Verwendung als Selektivitätsfunktion bei der Suche nach Kinasen in verschiedenen Zelltypen[11].

1.5.3 Vorinostat

Vorinostat (Abbildung 6) (Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA)) ist ein Zytostatikum, dass in der Krebsmedikation eingesetzt wird. Im Handel ist es als das verschreibungspflichtige Medikament Zolinza R erhältlich. Die Wirkung basiert auf der Hemmung von Histon-Deacetylasen. Über Acetylierung und Deacetylierung wird in der Zelle die Transkription der DNA reguliert. Wird der Deacetylierungsprozess gehemmt, kommt es zu einer Überacetylierung. Dies führt zur Apoptose (kontrollierter Zelltod) der Krebszellen.



Vorinostat

Abbildung 6: Struktur Vorinostat

So zeigt SAHA unter anderem Aktivität gegenüber den menschlichen Prostata-Krebszelllinien LNCaP, DU145, LAPC4 und PC3. Bei den Zelllinien LNCaP, DU145 und LAPC4 erfolgt eine vollständige Inhibierung des Zellwachstums bei einer Konzentration von 2.5 µm nach 72 h. Eine vollständige Unterdrückung des Zellwachstums von PC3-Zellen erfolgt erst bei einer Konzentration von 10 µm. Die Apoptose dieser Zellen trat erst nach einer Verdopplung der Konzentration auf^[31, 32]. Durch den Vergleich mit bekannten Ergebnissen mit Vorinostat als Selektivitätsfunktion^[27], lassen sich neuartige Capture Compounds mit Vorinostat als Selektivitätsfunktion gut untersuchen und bewerten.

Kern und Selektivitätsfunktion eingefügt werden müssen, ist min. mit einer Verdopplung der Molmasse und des sterischen Anspruchs der Capture Compound zu rechnen.

Ein weiterer Nachteil des Biotins ist, dass es nicht fluoresziert oder UV-aktiv ist und sich so nicht in Echtzeit spektroskopisch verfolgen lässt. Eine solche Detektierfunktion würde das spezifische Markieren von Proteinen mit der Capture Compound *in vivo* gestatten. Über eine spektroskopische Verfolgung dieser markierten Proteine wäre es möglich zelluläre Vorgänge besser verfolgen und verstehen zu können.

Zusätzlich zu der fehlenden Möglichkeit Biotin spektroskopisch (UV wie auch Fluoreszenz) in einer biologischen Probe zu detektieren, existieren auch endogen biotinylierte Proteine^[34] in den eingesetzten Lysaten. Diese zum Teil hochabundanten Proteine werden durch die Streptavidin-Beads ebenfalls isoliert und können in der MS-Analytik die Identifizierung der Zielproteine verhindern. Dieses Problem tritt insbesondere auf, wenn die Zielproteine gering abundant sind und würde bei der Optimierung und Entwicklung von Medikamenten ein großer Nachteil sein. Daher wäre eine Sortierfunktion, die orthogonal zu biologischen Systeme ist, wünschenswert. Eine weitere Einschränkung der CCMS-Technologie liegt in der gesamten Struktur der Capture Compounds (Abbildung 8).

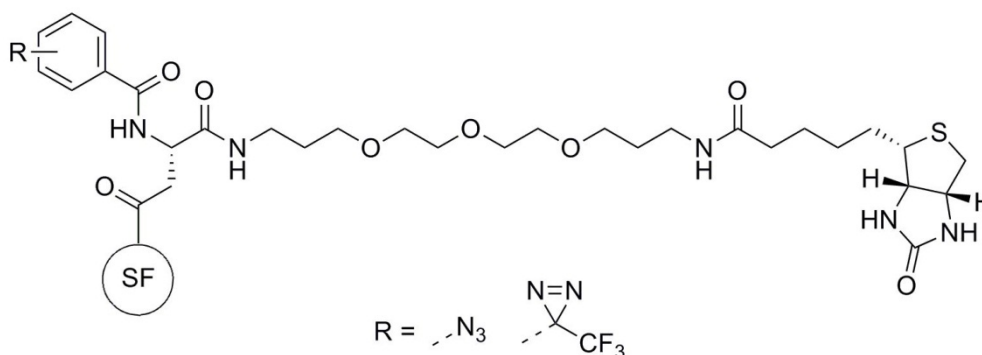


Abbildung 8: Struktur der bisher verwendeten Capture Compounds

Diese beinhaltet keinerlei Möglichkeit, einen Teil des Scaffolds oder auch die gesamten Capture Compound spezifisch nach Isolierung der gewünschten Proteine von diesen wieder zu entfernen. Dies würde dazu führen, dass unspezifisch isolierte Proteine vor der MS-Analytik entfernt werden würden. Interne Untersuchungen haben gezeigt, dass sehr viel unspezifischer Hintergrund allein durch die Wechselwirkung von Proteinen mit den Magnetbeads generiert wird (Abbildung 9). Die abgebildeten Gelbanden zeigen den Hintergrund im *E.coli* und HepG2-Lysat, der während eines Capture Experimentes allein durch Wechselwirkung mit den Beads in Abwesenheit einer Capture Compound generiert wird.

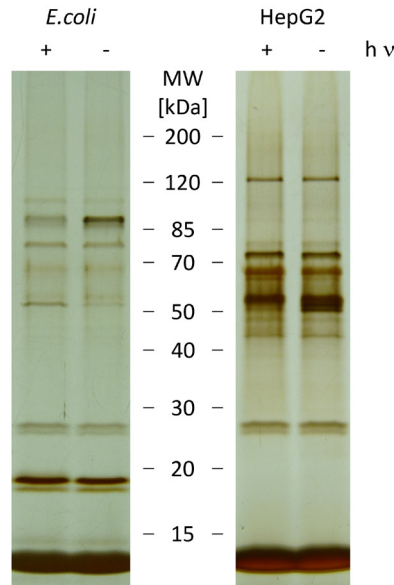
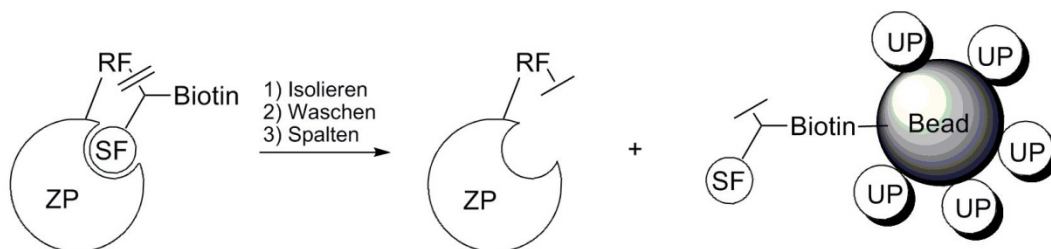


Abbildung 9: Unspezifischer Hintergrund in E.coli - bzw. HepG2-Lysat
 + Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$)
 – nicht mit UV-Licht bestrahlt

Es ist sehr gut zu erkennen, dass es nicht von Bedeutung ist, ob das Lysat in Anwesenheit von Beads mit UV-Licht bestrahlt oder nicht bestrahlt wird. Massenspektrometrisch wurden bis zu 362 unspezifische Proteine (UPs) gefunden, die nicht durch verschiedene Waschschritte entfernt werden konnten. Dieser Hintergrund ließe sich durch eine zusätzliche Spaltfunktion von den Zielproteinen entfernen. Schema 6 zeigt vereinfacht, wie ein solches Experiment aussehen könnte. Nach erfolgreichem Capturen, anschließender Isolierung und Waschen, würde ein Reagenz zugesetzt werden, dass selektiv die Spaltstelle adressiert und dort das Scaffold spaltet.

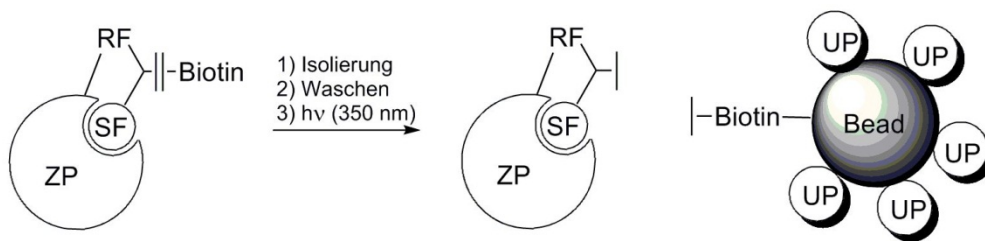


Schema 6: Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgreichem Capturen - Teil 1

In diesem Fall würde die Spaltung zwischen der Reaktivitätsfunktion und dem Rest der Capture Compound erfolgen. Dadurch wäre das Zielprotein nur noch mit der Reaktivitätsfunktion markiert, was zu einer vereinfachten Analyse führen könnte, da die durch tryptische Fragmentierung erhaltenen Peptide der Crosslinkposition nur mit einer definierten

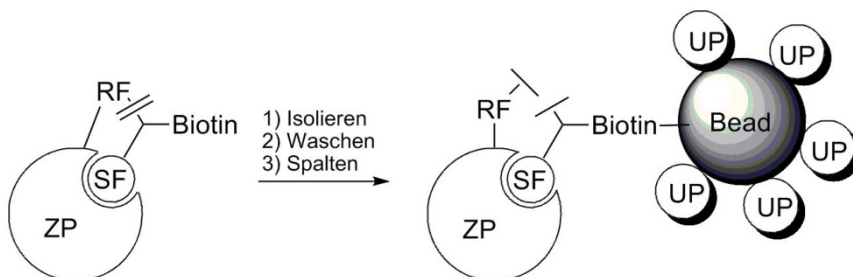
Masse markiert sind. Gelingt die Spaltung so schonend, dass das Zielprotein (ZP) nach Freisetzung noch immer aktiv ist, wären anschließende Untersuchungen am gereinigten und noch aktiven Protein möglich.

In Schema 7 ist eine weitere Möglichkeit der selektiven Spaltung dargestellt, die zum selben Zeitpunkt wie in Schema 6 gezeigt, jedoch nur an einer anderen Position stattfindet. Wie dargestellt wird das Scaffolds von den Beads abgespalten. Diese Möglichkeit wäre vor allem bei sehr stark bindenden Zielproteinen zu bevorzugen, da die Selektivitätsfunktion im aktiven Zentrum verbleiben könnte.



Schema 7 Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgten Capturen - Teil 2

Diese Möglichkeit der Spaltung besitzt gegenüber der in Schema 6 erläuterten Variante, dass sie unabhängig von der Bindungsstärke des Zielproteins arbeitet, da die Selektivitätsfunktion im Protein verbleiben würde. Dies ist besonders bei der Validierung von neuen, in ihrer Funktion unbekannten Zielproteinen von Bedeutung, da nicht immer deren Bindungsstärken bekannt sind. Sind diese zu hoch, könnte trotz Spaltung, wie in Schema 6 gezeigt, keine Ablösung von den Magnetpartikeln erreicht werden (Schema 8).



Schema 8: Nachteil bei der Spaltung hinter der Reaktivitätsfunktion bei zu hohen Bindungsstärken von Zielproteinen

1.7 Click-Reaktionen

Um in biologischen Systemen kontrolliert und erfolgreich chemische Reaktionen durchführen zu können, müssen diese Reaktionen folgende Kriterien erfüllen:

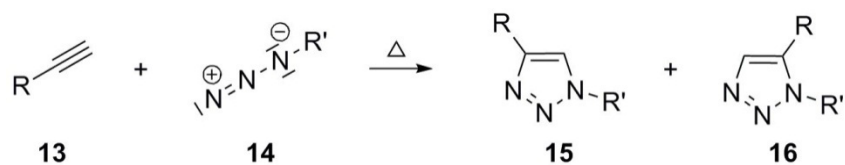
- hohe Ausbeuten ohne störende Nebenprodukte
- einfache Reaktionsführung (Unempfindlichkeit gegenüber Wasser und Sauerstoff)
- geringe Reaktionstemperatur (max. 37 °C)
- durchführbar in Gegenwart von Aminen, (Thio-)alkoholen und Carbonsäuren
- bioorthogonale Reaktion mit einem definierten Reaktionspartner

Die Reaktionen, die diese Bedingungen erfüllen, werden in der Gruppe der Click Reaktionen zusammengefasst. Die Click-Reaktionen beinhalten eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionsarten, wie:

- 1,3-Dipolare Cycloaddition^[35, 36],
- Staudinger Ligation^[37, 38]
- Diels-Alder-Reaktion^[39, 40, 41]
- Thiol-en-Reaktion^[42].

Die oben aufgeführten Reaktionen erfüllen die Kriterien und haben sich zu geeigneten Werkzeugen entwickelt, um in biochemischen Systemen sehr spezifisch chemische Reaktionen durchzuführen, ohne das biologische System zu verändern oder zu schädigen^[43].

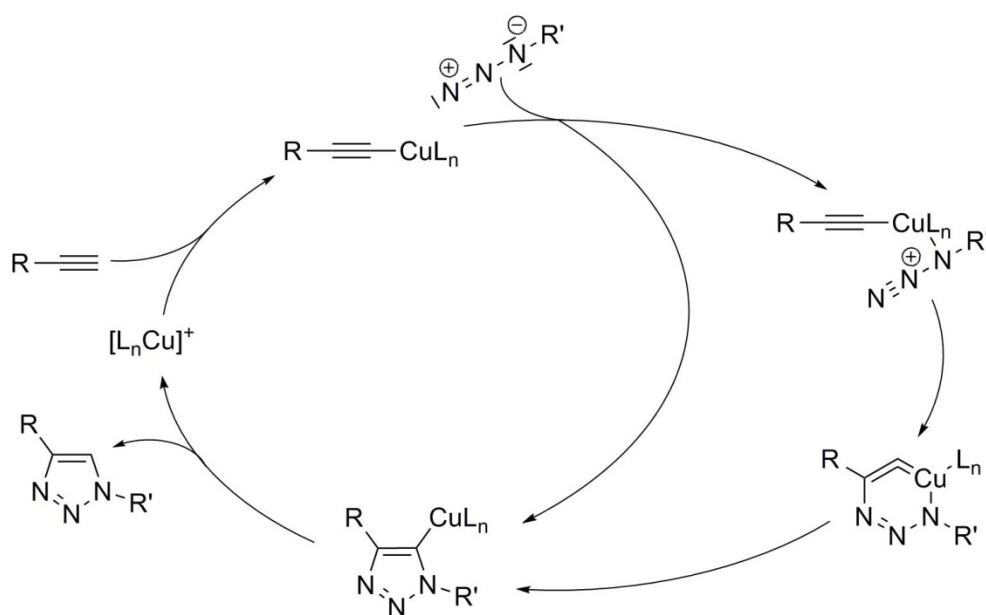
Je nach biochemischer Fragestellung bedient man sich unterschiedlicher Reaktionstypen. Der gebräuchlichste Reaktionstyp ist die 1,3-Dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin **13** und einem Azid **14** (Schema 9).



Schema 9: Thermisch induzierte 1,3-Dipolare Cycloaddition

Diese Reaktion wurde erstmals A. Michael beobachtet^[44] und von Huisgen genauer untersucht und beschrieben^[45]. Jedoch würde diese Reaktion unter ihren ursprünglichen Bedingungen in keiner Weise die harten Kriterien der Click-Chemie erfüllen (Schema 9). Zu einem muss für eine erfolgreiche Cycloaddition das Reaktionsgemisch sehr stark erwärmt werden und zum anderen entstehen 2 Produkte, das 1,4-Triazol **15** und das 1,5-Triazol **16**.

Beide bilden sich ungefähr in einem Verhältnis von 1:1. Somit läuft diese Reaktion nicht unter bioorthogonalen Bedingungen ab und liefert keine regiospezifisch definierten Produkte in hohen Ausbeuten. Erst die von zwei voneinander unabhängigen Arbeitskreisen durchgeführte Weiterentwicklung zu einer Cu(I)-katalysierten Variante (Schema 10) beseitigt diese Nachteile^[46, 47]. Kupfer(I)-katalysiert erfolgt die Cycloaddition schon bei Raumtemperatur. Auch die Durchführung in wässrigen Systemen ist ohne weiteres möglich. Des Weiteren ist der Nachteil der nicht vorhandenen Regioselektivität so gut wie aufgehoben, da sich fast ausschließlich das 1,4-Triazol bildet^[46, 47].



Schema 10: Cu(I)-katalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition

Seit der Entwicklung dieser sehr leicht und trotzdem zuverlässig laufenden Variante der 1,3-Dipolaren Cycloaddition etablierte sie sich zu einer der bedeutendsten und am weitverbreitetsten Vertreter der Click-Reaktion. Es wurde vielfach gezeigt, dass sich mit ihrer Hilfe sehr gezielt Kleinmoleküle in biochemischen Systemen adressieren, markieren und sich biologische Proben somit leichter analysieren lassen^[9, 35, 48, 49].

2 Zielstellung & Motivation

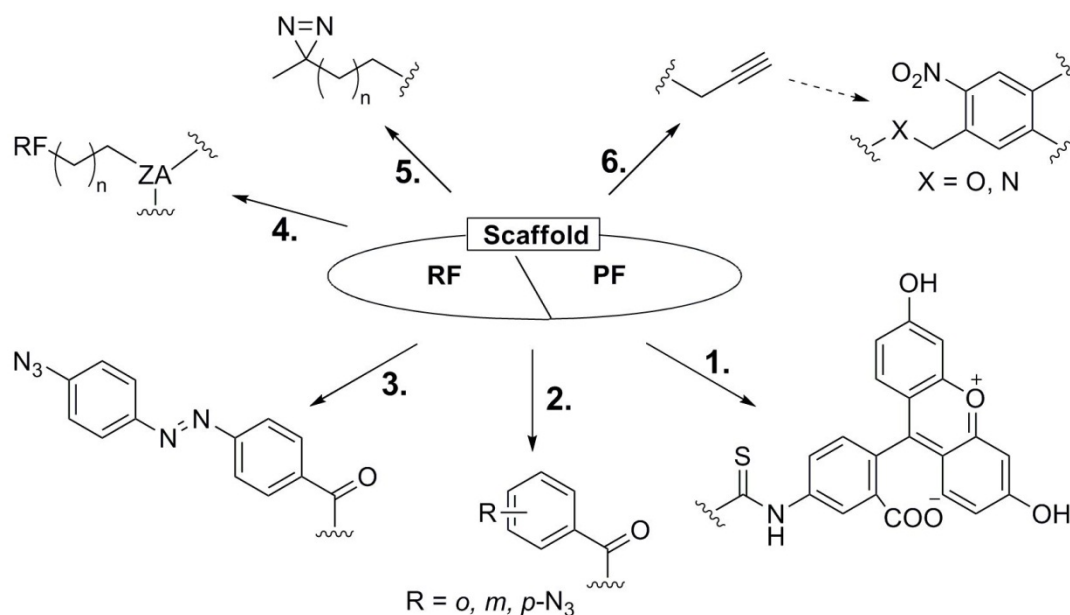
Obwohl in den letzten 10 Jahren seit der Patentierung weitere verschiedene Arbeiten veröffentlicht wurden^[50, 51, 52] die sich ebenfalls mit dieser Methode der Proteinidentifizierung und -markierung befasst haben, ist eine systematische Untersuchung bezüglich eines optimalen Scaffolds nicht durchgeführt worden.

Das Ziel dieser Arbeit ist, neuartige Scaffolds zu entwickeln, die nicht mehr den im Kapitel 1.6 beschriebenen Einschränkungen unterliegen bzw. neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen. Die Scaffolds sollen jedes für sich für eine definierte Fragestellung optimal geeignet sein. Es sollen folgende Anwendungen und Eigenschaften etabliert werden:

1. selektive Fluoreszenzmarkierung
2. Optimierte Crosslinkausbeute
3. Funktionelle Isolierung von nativen Proteinen
4. Optimierter Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und zentralem Atom
5. Minimierung des sterischen Anspruches von Reaktivitätsfunktionen
6. alternative Pullout-Funktion, Permeabilität & Konzepterweiterung auf Basis einer alternativen Pullout-Funktion

Diese Variationen des Scaffoldes beziehen sich hauptsächlich auf die Pulloutfunktion (PF) und die Reaktivitätsfunktion (RF) (Schema 11). So beinhaltet Punkt 1 die Entwicklung von Pullout-Funktionen, die gleichzeitig auch als Detektierfunktionen verwendet werden können, was die selektive Markierung von Zielproteinen mit einem Fluorezenzfarbstoff gestattet. Der Punkt 2 beinhaltet eine genaue Untersuchung, inwieweit die Positionierung der reaktiven Gruppe am Aromaten Einfluss auf die Crosslinkingausbeute hat. Weiter soll im Punkt 3 die Anwendung von spaltbaren Reaktivitätsfunktionen (z.B. auf Basis von Azo-Verbindungen) für die funktionale Isolierung von nativen Proteinen untersucht werden. Aromatische Azo-Verbindungen lassen sich reduktiv (z. B. mit Natriumdithionit) spalten^[53, 54]. Nach der Isolierung des Zielproteins wäre eine Abspaltung der Capture Compounds nach Schema 6 möglich, was in biologischen Proben an ähnlichen Systemen bereits gezeigt wurde^[6, 55, 56]. Auch ist die Verwendung von Si-O- oder auch S-S-Bindungen denkbar, die sich ebenfalls unter schonenden Bedingungen spalten lassen^[57]. Im Punkt 4 wird der Einfluss des Abstandes

zwischen Reaktivitätsfunktion und dem zentralen Atom (ZA) des Scaffolds auf das Capture Verhalten hin untersucht. Gleichzeitig soll ein Vergleich von Kohlenstoff mit Stickstoff als Zentralatom vorgenommen werden, da Stickstoff nicht den Einschränkungen eines Stereozentrums unterliegt. Die Punkte 5 und 6 beinhalten unterschiedliche Erweiterungsmöglichkeiten der Funktionalität des Scaffolds, die jedoch dasselbe Ziel, die Permeabilität von Scaffolds und Capture Compounds, beinhalten. Im Punkt 5 wird die Anwendung von aliphatischen Diazirinen als Reaktivitätsfunktion untersucht. Bei erfolgreicher Anwendung solcher sterisch anspruchslosen Diazirine, könnten diese in Verbindung mit einer alternativen Pulloutfunktion (z.B. einer Kupfer(I)-katalysierten Cycloaddition von Alkinen und Aziden, 6.) zur Darstellung von kleinen, zellgängigen molekulare Sonden führen.



Schema 11: Überblick wichtiger Strukturmerkmale zukünftiger Scaffolds

Eine Möglichkeit den unspezifischen Hintergrund zu verringern, ist die photochemische Abspaltung der Proteinkonjugate von den Beads. Dies sollte bei der Verwendung von *o*-Nitrobenzylether unter schonenden Bedingungen möglich sein^[58, 59]. *o*-Nitrobenzylether können in Verbindung mit der zuvor beschriebenen Kupfer(I)-katalysierten Cycloaddition eingesetzt werden^[60, 61], was zu einer Konzepterweiterung des Click-Systems führen würde. Dies würde dazu beitragen, dass die unnötige Analyse des unspezifischen Hintergrundes auf ein Minimum reduziert wird.

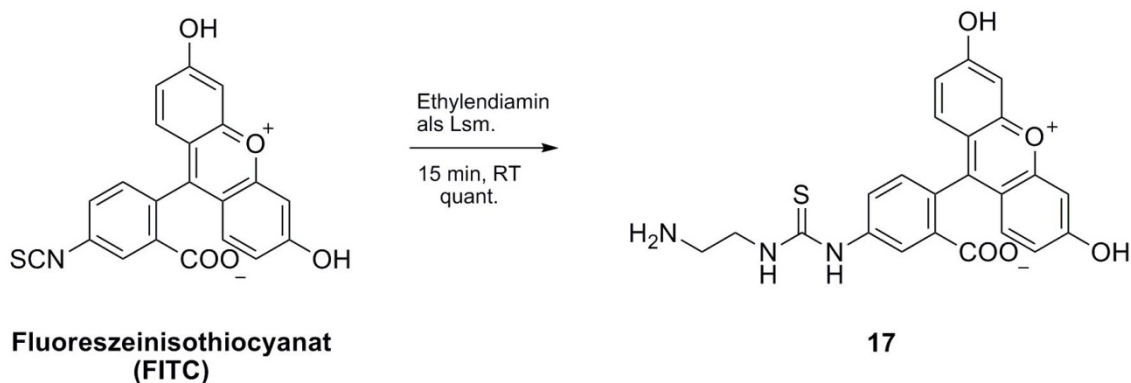
3 Ergebnisse

3.1 Fluoreszierende Scaffolds & Capture Compounds

Im folgenden Abschnitt wird die Entwicklung von fluoreszierenden Capture Compounds für die selektive Fluoreszenzmarkierung von Proteinen beschrieben. In Zusammenarbeit mit der UP Transfer GmbH - Projektgruppe: Hybrotec wurde in diesem Zusammenhang ein auf Fluorophor-anti-Fluorophor-Antikörper^[62, 63, 64, 65] basierendes Pullout-System entwickelt, mit dem endogene biotinylierte Proteine nicht mitisoliert werden. Als Farbstoffe wurden Fluorescein und TAMRA verwendet.

3.1.1 Stabilitätsuntersuchungen – Photostabilität von Farbstoffe

Um in einem Capture Experiment als Detektier- und/oder als Sortierfunktion effektiv wirken zu können, muss der Fluorophor stabil unter den gegebenen Capture-Bedingungen, insbesondere UV-Licht, sein. Für grundlegende Stabilitätsuntersuchungen wurde das Fluoresceinderivat **17** verwendet, indem der eingefügte Ethylendiaminlinker (Schema 12), das Scaffold simulierte. Die erhaltenen Daten sollten durch den vorhandenen Linker direkt auf die Photostabilität der Scaffolds übertragbar sein.

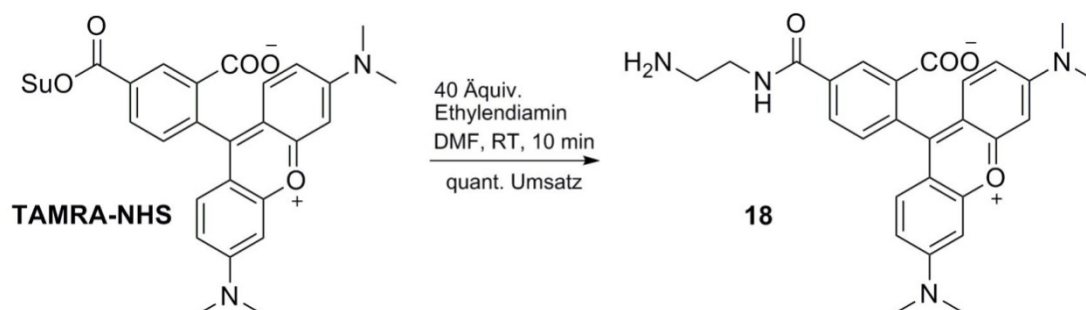


Schema 12: Synthese der Fluorescein Modellverbindung **17**

In Anlehnung an literaturbekannte Synthesen^[66] von ähnlichen Fluoresceinderivaten erfolgte die Umsetzung mit Ethylendiamin (Schema 12). Es wurde in großem Überschuss (als Lösemittel) eingesetzt, was Schutzgruppenoperationen unnötig machte. Eine Aufreinigung des erhaltenen Produktes **17** war nicht notwendig, da Nebenreaktionen nicht beobachtet wurden. Das Fluoresceinderivat **17** wurde für folgende Stabilitätsuntersuchungen weiter eingesetzt. Neben dem dargestellten Fluoresceinderivat **17** wurden auch weitere Farbstoffe auf ihren Photostabilität in der caproBox hin untersucht. Insgesamt wurden Fluorophore aus drei verschiedenen Farbstoffklassen getestet:

- Fluorescein & Rhodamine
- Pyridiniumcumarine
- Cyanine & Hemicyanine

Die Farbstoffe wurden für diese Testzwecke freundlicherweise von den Firmen Dyomics GmbH und raytest Isotopenmessgeräte GmbH und dem Kooperationspartner Hybrotec zur Verfügung gestellt. Alle, bis auf TAMRA, besaßen einen Linker, der ähnlich dem in Schema 12 eingefügten aliphatischen Linker war. Aus Gründen der Vergleichbarkeit, wurde TAMRA, ausgehend von dem käuflich erhältlichen NHS-Ester, ebenfalls mit Ethylendiamin umgesetzt (Schema 13).



Schema 13: Synthese der TAMRA Modellverbindung **18**

Aufgrund entstandener Nebenprodukte, war im Gegensatz zu **17** eine chromatographische Reinigung notwendig. Nach der Entfernung des Acetonitrils, wurde der pH-Wert durch Zugabe von verdünnter wässriger Ammoniaklösung auf 7,5 – 8 eingestellt und die Lösung für die Photostabilitätsuntersuchungen eingesetzt. Als erstes wurde die Gruppe der Fluorescein- und der Rhodaminfarbstoffe auf ihre Stabilität hin untersucht. Dazu wurden die Proben für 1 – 60 min in der caproBox ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $T = 1 - 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) bestrahlt und anschließend UV-Vis-spektroskopisch analysiert. Die Strukturen der einzelnen Farbstoffe sind, bis auf den rhodaminbasierenden Fluorophor **DY-555**, in Abbildung 10 dargestellt.

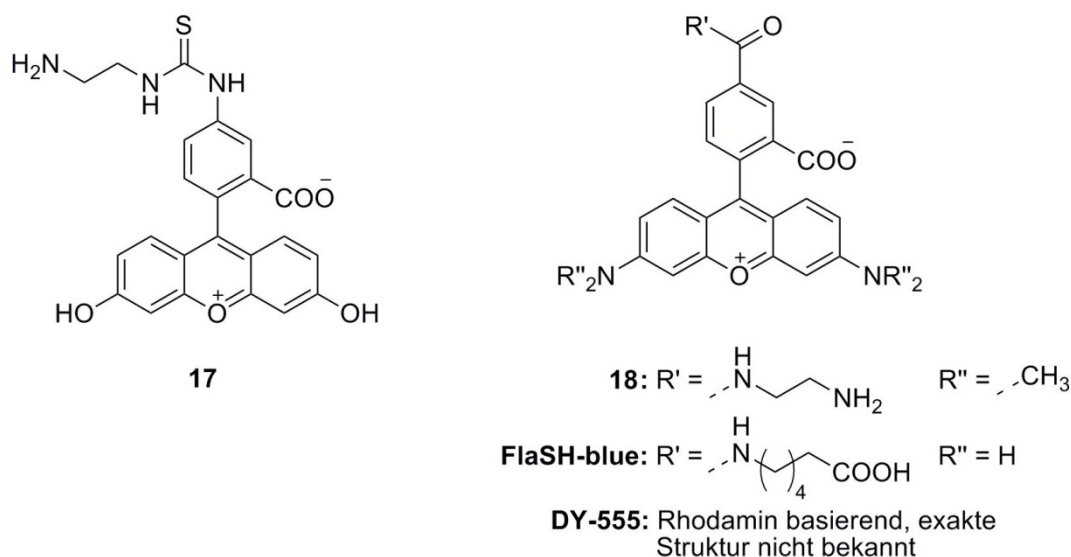


Abbildung 10: Strukturelle Übersicht getesteter Rhodamin- und Fluoresceinfarbstoffe

Von **DY-555** war nur bekannt, dass es sich um einen Rhodaminfarbstoff handelt. Die exakte Struktur des Farbstoffes wurde von Dyomics nicht bekannt gegeben. Die erhaltenen Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind zusammengefasst in Abbildung 11 dargestellt.

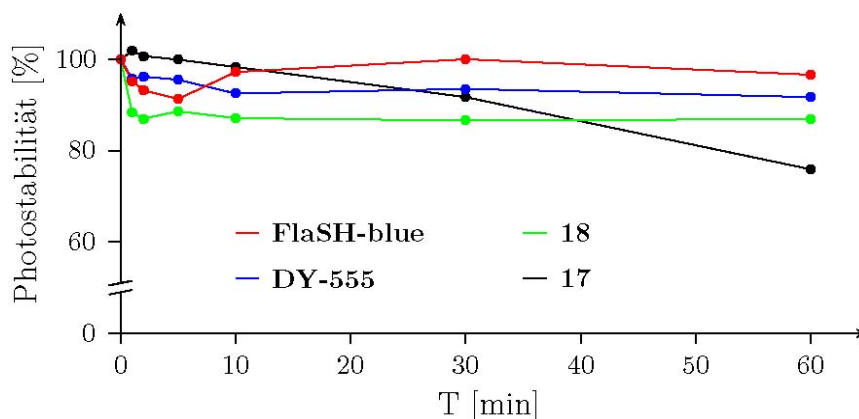


Abbildung 11: Photostabilität getesteter Rhodamin- und Fluoresceinfarbstoffe

Es hat sich gezeigt, dass alle Rhodamine in den ersten 2min einen Abfall der Intensität aufweisen, die dann jedoch in den folgenden Minuten konstant bleibt. Dass es bei dem Farbstoff **FlaSH-blue** sogar wieder zu einer Zunahme der Intensität kommt, ist ohne Strukturaufklärung nicht erklärbar. Das Fluoresceinderivat **17** wies in den ersten Minuten der Bestrahlung die größte Stabilität auf, die jedoch im Gegensatz zu den anderen getesteten Derivaten bei fortlaufender Bestrahlung am stärksten abnahm. Da während eines Capture Experimentes typischer Weise nicht länger als 10 min (max. 30 min) bestrahlt wird, wäre die gemessene Stabilität von ca. 90 % bei 30 min immer noch ausreichend. Eine Isolierung und Charakterisierung von Photolyseprodukten wurde nicht vorgenommen.

3 Ergebnisse

Die Gruppe der Pyridiniumcumarine beinhaltet vier unterschiedliche Farbstoffe (Abbildung 12). Diese Fluorophore besitzen ein ungewöhnlich breites Absorptionsspektrum.

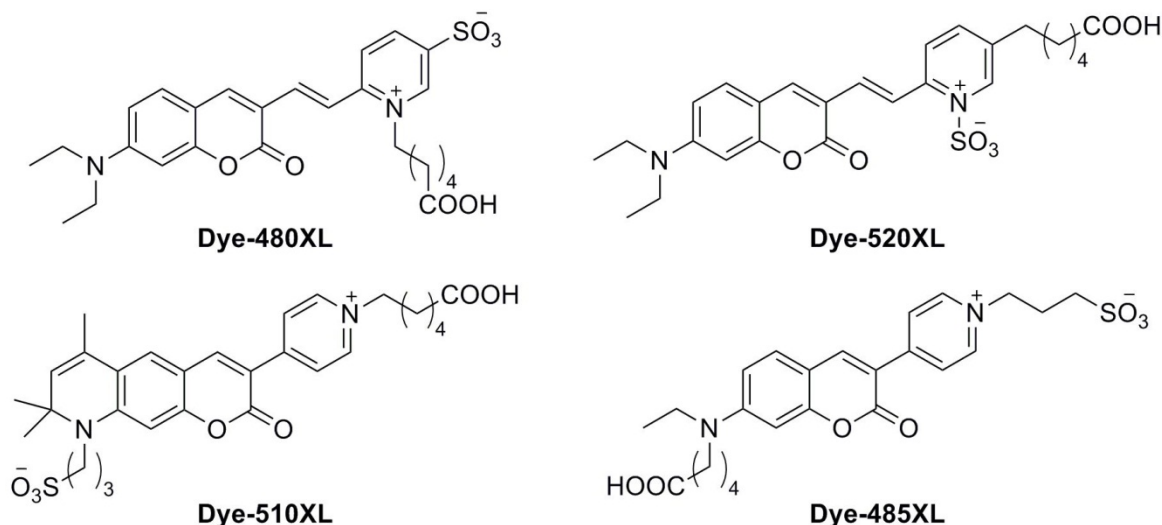


Abbildung 12: Strukturelle Übersicht getesteter Pyridiniumcumarine

Es zeigte sich, dass bis auf **DY-520XL** die gemessenen Farbstoffe eine hervorragende Photostabilität (> 90 %) aufwiesen (Abbildung 13).

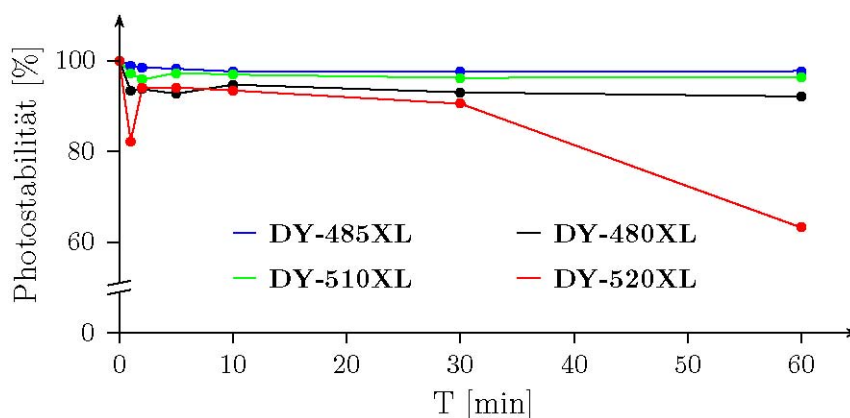


Abbildung 13: Photostabilität getesteter Pyridiniumcumarine

Auffallend war, dass hier der schon bei den Rhodaminen beobachtete Abfall in den ersten Minuten, ebenfalls auftrat. Wie auch bei den Rhodaminen blieb die Intensität anschließend bei einem konstanten Wert, ausgenommen **DY-520XL**.

Die letzte Gruppe getesteter Farbstoffe, die Cyanine und Hemicyanine, zeichneten sich durch die größtstrukturelle Vielfalt des Fluorophors aus (Abbildung 14). Bei dem Farbstoff **Cy-5** handelt es sich nicht um den gleichnamigen, in sog. DIGE-Experimenten^[67, 68] eingesetzten Farbstoff. Der wesentliche Unterschied beider Farbstoffe ist das Fehlen der Sulfonsäuregruppe bei der hier verwendeten Verbindung. Bevor der wesentlich teurere DIGE-

3 Ergebnisse

Farbstoff gekauft worden wäre, wurden erst die Ergebnisse der durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen abgewartet.

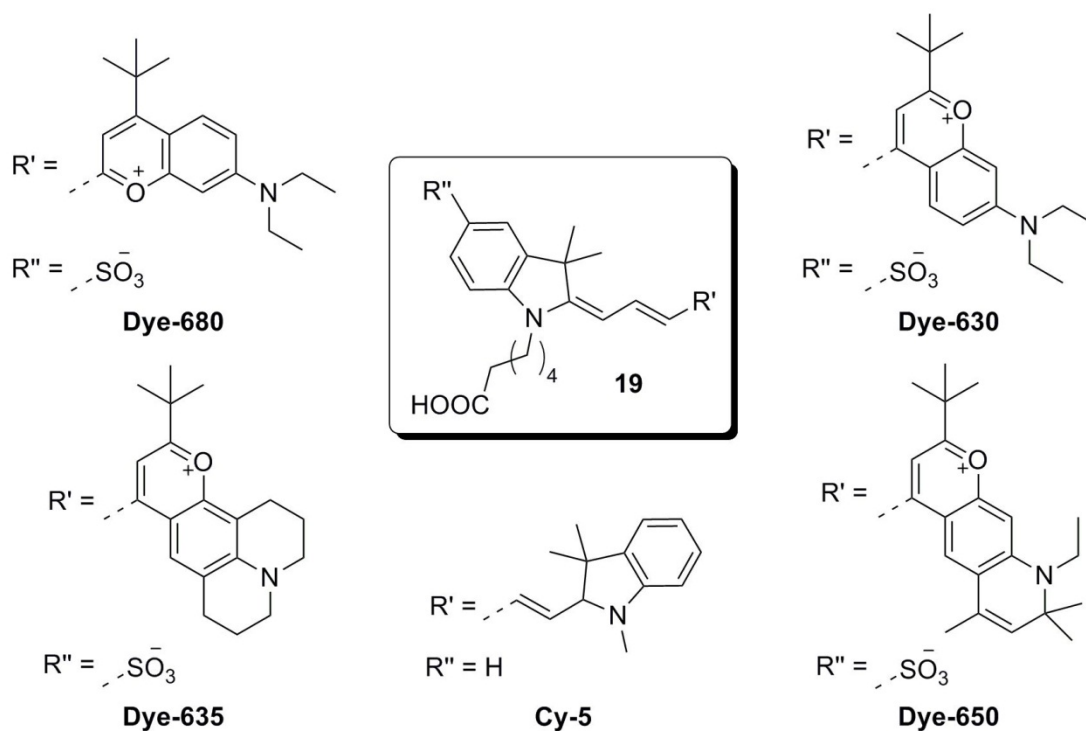


Abbildung 14: Strukturelle Übersicht getesteter Cyanine und Hemicyanine

Dabei stellte sich heraus, dass Farbstoffe dieser Klasse, dabei insbesondere **Cy-5**, die geringste Photostabilität von allen getesteten Fluorophoren gegenüber UV – Licht ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$) besitzen (Abbildung 15).

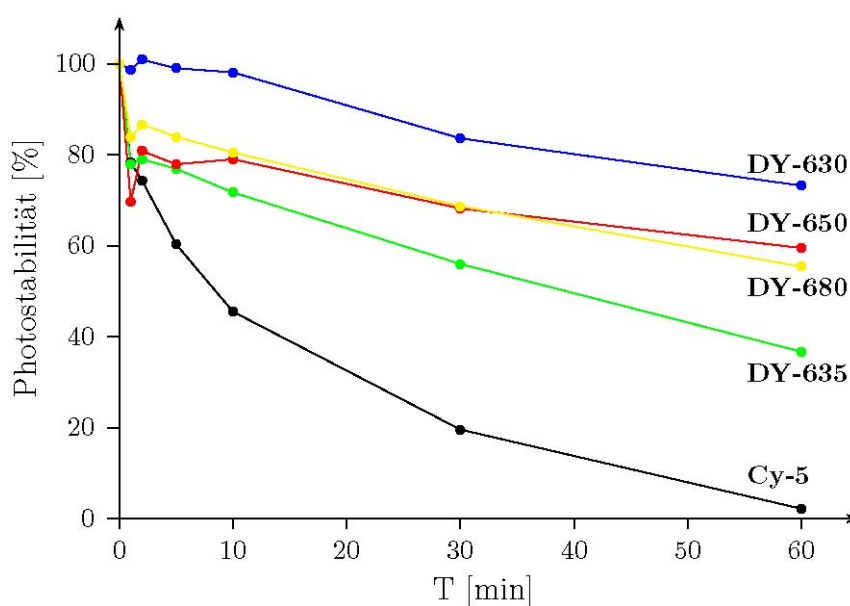


Abbildung 15: Photostabilität getesteter Cyanine und Hemicyanine

Allein **DY-630** weist eine akzeptable Photostabilität auf, welche mit der des Fluoresceinderivates **17** vergleichbar ist. Besonders der Abbau von **Cy-5** konnte bereits mit bloßem Auge während des Experimentes verfolgt werden. So führte die Bestrahlung der Probe von einer Stunde zum kompletten Entfärben der Lösung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde darauf verzichtet, weitere preisintensive Farbstoffe dieser Klasse, z. B. die des DIGE-Verfahrens, zu untersuchen. Abschließend ist festzuhalten, dass sich für eine potentielle Anwendung im Rahmen der CCMS-Technologie Fluorescein/Rhodamin-Derivate wie auch Pyridiniumcumarine eignen.

Für weitere Synthesen von fluoreszierenden Scaffolds und Capture Compound wurde neben dem als Testsystem geplanten Fluorescein auch in Absprache mit dem Kooperationspartner TAMRA gewählt.

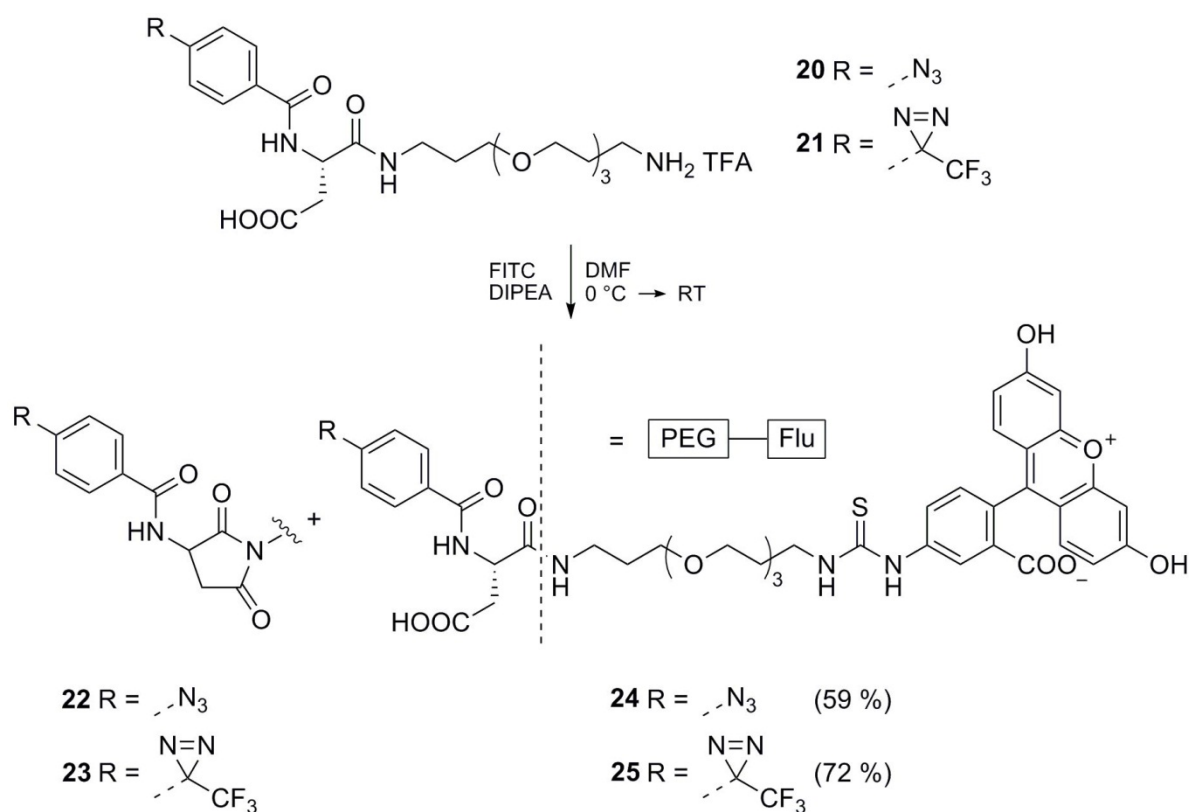
3.1.2 Stabilitätsuntersuchungen – Biostabilität von Fluorescein

Neben der Photostabilität muss auch sichergestellt sein, dass die verwendeten Fluorophore keine lichtinduzierten Reaktionen mit dem Zelllysaten eingehen, was in späteren biochemischen Untersuchungen zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Dazu wurde das schon bei der Untersuchung der UV-Stabilität verwendete Fluoresceinderivat **17** als gepufferte Lösung zum *E.coli* - bzw. HepG2-Zelllysate hinzugesetzt. Die Endkonzentration der Testverbindung **17** lag bei 5 µM, was einer realistischen Konzentration für Capture Compounds in Zelllysaten entspricht. Diese Lösungen wurden ebenfalls in der caproBox für eine Stunde bestrahlt. Als Vergleichsproben wurden identische unbestrahlte Lösungen analysiert. Dies geschah anhand von SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot. Dazu wurde der Western Blot mit dem Sekundär-anti-Fluorescein-Antikörper B13-DE1[64] entwickelt, was die selektive Detektion von fluoresceintragenden Proteinen ermöglicht. Jedoch konnten keine fluoreszierenden Proteine im Western Blot nachgewiesen werden.

Eine lichtinduzierte Wechselwirkung von Fluorescein und Proteinen konnte aufgrund dieses Ergebnisses ausgeschlossen werden. Es wurde darauf verzichtet, die gleichen Versuche auch mit TAMRA durchzuführen. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit beider Verbindungen bei gleichzeitig geringerer Funktionalität des TAMRA (z.B. kein freien Phenole) wurde davon ausgegangen, dass TAMRA sich ebenso inert unter den oben angeführten Versuchsbedingungen verhält.

3.1.3 Synthese von Fluorescein-Scaffolds und Capture Compounds

Für die Synthese der Fluorescein-beinhaltenden Scaffolds wurde FITC mit den Literatur beschriebenen Aminen^[12] **20** und **21** umgesetzt (Schema 14). Diese lagen als TFA Salz vor, was die Zugabe einer Base notwendig machte. Für die eigentliche Reaktion zwischen FITC und den Aminen war die Base nicht notwendig.



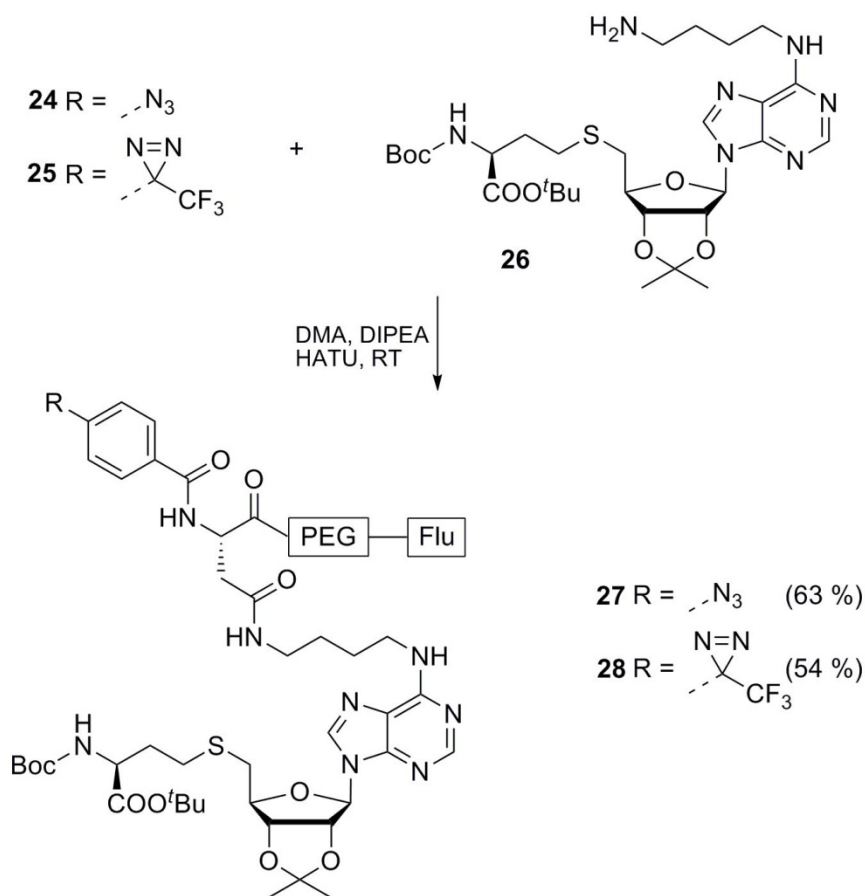
Schema 14: Synthese von Fluorescein-Scaffolds

Die Reaktionen erfolgten unter Lichtausschluss, um eine Aktivierung der Reaktivitätsfunktionen zu vermeiden. Dies wurde auch während sämtlicher nachfolgenden Schritte (Reinigung, Analyse) der Proben so weit wie möglich und praktikabel eingehalten. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch HPLC-MS Messungen, was eine massenspektrometrische Identifizierung von Edukten und Produkten erlaubte. Neben der gewünschten Bildung des Thioharnstoffes trat eine Cyclisierungsreaktion der Scaffolds als Nebenreaktion auf. Durch die Bildung eines stabilen 5-Ringsystems unter Wasserabspaltung ist diese Nebenreaktion thermodynamisch wie entropisch bevorzugt, was die intramolekulare Reaktion zwischen der freien Säure und dem Amid bereits ohne Aktivierung der Carbonsäure ermöglicht. Da es aber nur in geringen Mengen zu dieser Nebenreaktion kam (ca. 10 %) und das Nebenprodukt chromatographisch abtrennbar war, wurde auf eine Anpassung der

Synthesestrategie verzichtet. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion nicht aufgearbeitet, sondern die nach entfernen des Lösemittels erhalten Rückstände direkt säulenchromatographisch gereinigt. Als Selektivitätsfunktion wurde SAH gewählt, da mit SAH-tragenden Capture Compounds die meiste Erfahrung bei caprotec vorlag. Die Synthese der SAH-Capture Compounds erfolgte zweistufig, da SAH nur als geschütztes Derivat **26**^[12], eingesetzt werden konnte. Entgegen der Literaturvorschrift^[12] wurde aufgrund der einfacheren Handhabung die Amidkupplung mit O-(7-Aza-1-benzotriazolyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU)^[69, 70] und DIPEA anstelle von 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt), Diisopropylcarbodiimid (DCC) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) durchgeführt.

Der Vorteil von HATU liegt in der Kombination von hoher Reaktivität und guter Handhabbarkeit. Als stabiles Carbodiimid-HOBt-Addukt besitzt es eine hohe Reaktivität um Carbonsäuren in situ zu aktivieren und lässt sich gleichzeitig als Feststoff sehr gut handhaben. Ein potentieller Nachteil ist, dass das am besten geeignete Lösemittel *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) ist. Aufgrund seines hohen Siedepunktes von 165 °C erfordert es beim Entfernen entweder starkes Erwärmen (min. 70 °C) oder die Verwendung von Hochvakuum. *N,N*-Dimethylformamid (DMF) eignet sich nicht als Lösesmittel, da es selber mit der aktivierten Carbonsäure reagiert. Andere gängige Lösemittel lösen HATU nur unzureichend, was deren Verwendung ebenfalls ausschließt. Typischerweise werden bei Amidverknüpfungen die Carbonsäuren mit dem jeweiligen Kupplungsreagenz erst voraktiviert, bevor das Amin hinzugesetzt wird. Um jedoch die intramolekulare Nebenreaktion der Cyclisierung möglichst zu unterdrücken (Schema 14), wurde HATU erst zum Schluss der schon das Amin enthaltenen Reaktionslösung hinzugesetzt. Dadurch gelang es, die schon bei der Scaffoldsynthese erwähnte Cyclisierung der Scaffolds zu **22** und **23** weitgehend zu unterdrücken. In Ausbeuten von 63 (**27**) bzw. 54 % (**28**) wurde ausreichend Material synthetisiert, um mit der weiteren Darstellung der fluoreszierenden SAH-Capture Compounds fortzufahren. Der entscheidende Schritt bei dieser Synthese war die letzte Stufe. Obwohl eine einfache Schutzgruppenoperation, ist die Entschützung aller drei säurelabilen Schutzgruppen in einem Schritt (Schema 16) der anspruchsvollste Teil der Synthese. In Anlehnung an die beschriebene Synthese^[12] von SAH-CCs und der intern vorgenommenen Optimierung der Synthese, wurde die Abspaltung mit 4M HCl in Dioxan durchgeführt (Schema 16). Da die glycosidische Bindung ebenfalls äußerst säureempfindlich ist, war es besonders wichtig, dass die Spaltung der Schutzgruppen bei einer Temperatur von – 20 °C durchgeführt wurde. Diese Temperatur ist ein Kompromiss, bei dem einerseits die Spaltung der glycosidischen Bindung

zurückgedrängt wird und andererseits die Hydrolyse der Schutzgruppen, insbesondere des *tert*-Butylesters in relativ kurzer Zeit noch möglich ist.

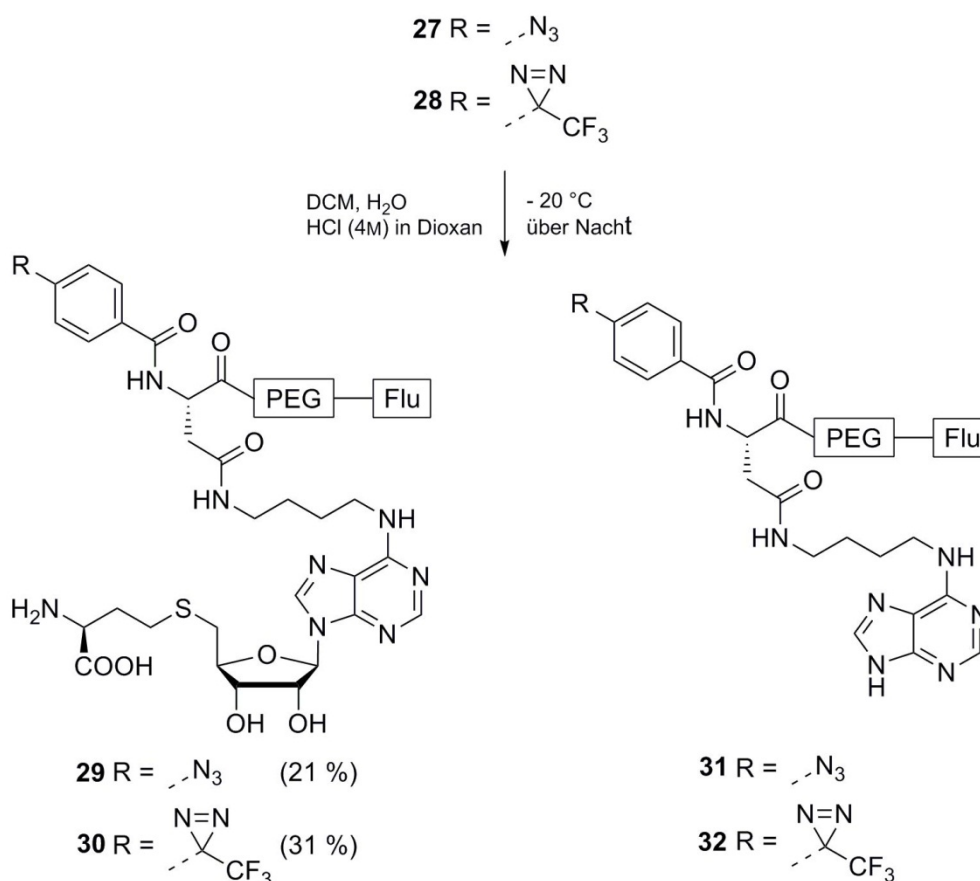


Schema 15: Synthese von geschützten SAH-Capture Compounds

Es wurde festgestellt, dass bei dieser Temperatur das explizite Zugabe von wenigen Prozent an Wasser für eine erfolgreiche Esterspaltung unerlässlich ist. Dazu wurde die Reaktionlösung auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und dann langsam unter starkem Rühren mit 4M HCl in Dioxan versetzt, um unnötiges Erwärmen zu vermeiden.

Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösemittel ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter vermindertem Druck entfernt und anschließend in der Kälte mit Triethylamin (TEA) versetzt. Dadurch wurde die Menge an potentiell störenden Salzen deutlich reduziert. Die nach chromatographischer Reinigung erhaltenen, geringen Ausbeuten von 31 bzw. 21 % waren nicht überraschend, da die Spaltung der glycosidischen Bindung nicht komplett unterdrückt werden konnte. Trotz der schlechten Ausbeute konnten ausreichende Mengen an **29** und **30** isoliert werden, damit in der Abteilung Biochemie die ersten Untersuchungen mit den Capture Compounds durchzuführen waren.

3 Ergebnisse



Schema 16: Entschützung von SAH-Capture Compounds

Bei den ersten Bestrahlsexperimenten mit den fluoreszierenden Scaffolds und Capture Compounds wurde eine überraschende Eigenschaft dieser Verbindungen gefunden. Die CC **29** mit einem Arylazid als Reaktivitätsfunktion war gegenüber Tageslicht empfindlicher als erwartet. Bei der Diazirin enthaltenen Verbindung **30** wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Es stellte sich bei daraufhin in der Abteilung Biochemie durchgeführten ersten Untersuchungen heraus, dass sich das Azid der Capture Compound **29** über die selektive Anregung des Fluoresceins aktivieren lässt, dass Diazirin in **30** jedoch nicht.

3.1.4 Photochemische Eigenschaften von Fluorescein-Scaffolds

Auf Grundlage der von der Abteilung Biochemie gefundenen überraschenden Ergebnisse wurde gezielt das photochemische Verhalten der beiden Scaffolds **24** und **25** untersucht. Dafür wurden beide Scaffolds mit einer blauen Diode mit einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ bei einem pH-Bereich von 7,5 – 8 bestrahlt, da dies dem pH-Bereich typische Capture-Experimente entspricht. Abbildung 16 zeigt das Emissionsmaximum im Vergleich zu dem Absorptionsmaximum des Fluoresceins.

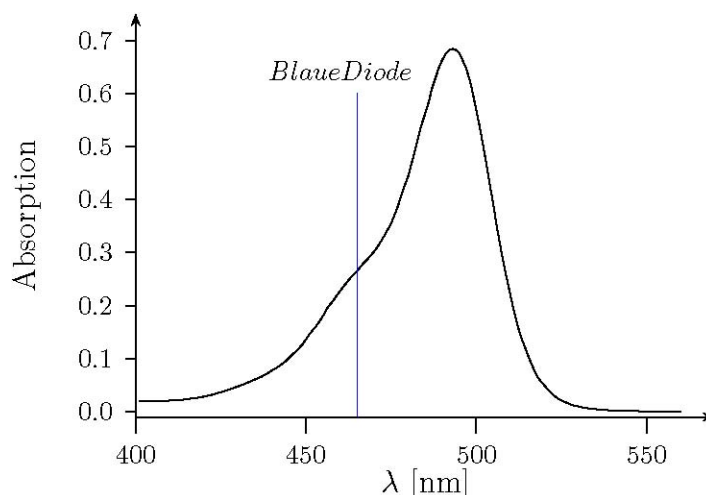


Abbildung 16: Emissionsmaximum der Blauen Diode im Vergleich zum Absorptionsmaximum des Fluoresceins

Trotz der Abweichung der Emissionswellenlänge der Diode vom Absorptionsmaximum des Fluoresceins reicht das blau emittierte Licht aus, um das Azid im Scaffold **24** schon nach 2 min vollständig umzusetzen. Das Diazirin in Scaffold **25** zeigte jedoch entsprechend den Ergebnissen mit CC **30** keinerlei Reaktion. Als Kontrollexperiment wurde der Versuch auch mit dem herkömmlichen Biotin Scaffold mit einem Arylazid unter identischen Bedingungen wiederholt. Dieses ließ sich nicht mit dem blau emittierten Licht anregen. Auch durch Zugabe von freiem Fluorescein im Molverhältnis 1:1 gelang eine Anregung nicht. Das kann bedeuten, dass einerseits ein intramolekularer Energietransfer stattfindet oder andererseits die Konzentration an freiem Fluorescein für einen intermolekularen Energietransfer deutlich erhöht werden muss. Bei der Bestrahlung des Scaffolds **24** in einer entgasten wässrigen Lösung unter Argon, gelang die Aktivierung ebenso rasch, wobei sich aber andere Abbauprodukte in der HPLC-MS-Analyse detektieren ließen. Dies deutet auf einen Einfluss von Sauerstoff bei der Produktbildung hin. Des Weiteren wurde der Einfluss des Lösemittels untersucht. So ließen sich Lösungen von **24** in unterschiedlichen Acetonitril/Wasser Gemischen unterschiedlich schnell anregen (Tabelle 1). Es ist überraschend, dass schon 20% Acetonitril genügen, um die Reaktion merklich zu verlangsamen (Tabelle 1, Eintrag 2).

3 Ergebnisse

Tabelle 1: Einfluss auf die Photoreaktivität von **24**

Eintrag	H ₂ O [%]	MeCN [%]	T [min] ^a
1	100	0	2
2	80	20	5
3	60	40	10
4	40	60	20
5	20	80	20
6	0	100	-

c = 50 μ M **24**, T = 1 – 4 °C, Bestrahlzeiten: 0 – 20 min,
^a Zeit bis zum vollständigen Abbau

Somit scheint die Protonenkonzentration von großer Bedeutung zu sein. Bei einer 80%igen Acetonitril Lösung beträgt der Überschuss an Wasser und somit auch der freibeweglichen Protonen ca. 6 Größenordnungen bezogen auf das Scaffold **24**.

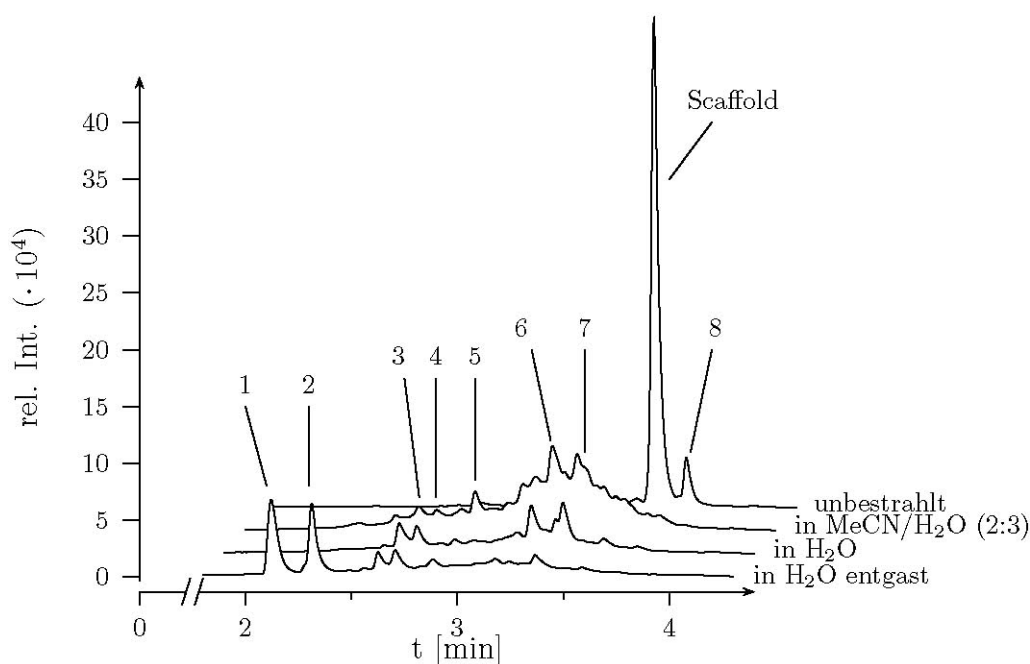


Abbildung 17: Vergleich der UV-Spuren der Abblitzprodukte von Scaffold **24** unter verschiedenen Bedingungen (c = 50 μ M), 1 – 8 siehe Tabelle 2

Trotzdem lässt sich das Azid nur sehr langsam anregen (Tabelle 1, Eintrag 5). In reinem Acetonitril wurde keine Reaktion mehr festgestellt (Tabelle 1, Eintrag 6).

Abbildung 17 zeigt eine Übersicht der UV-Spuren der erhaltenen Produkte die durch das Bestrahlen von **24** in unterschiedlichen wässrigen Lösungen entstanden sind. Es konnten besonders beim Wasser/Actonitril Gemisch nicht alle Peaks zugeordnet werden. Es sind nur solche im UV-Chromatogramm markiert, die eindeutig einer Masse zugeordnet werden konnten. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung aller Peaks mit eindeutigem Massensignal.

3 Ergebnisse

Tabelle 2: Abblitzprodukte von **24** unter verschiedenen Bedingungen

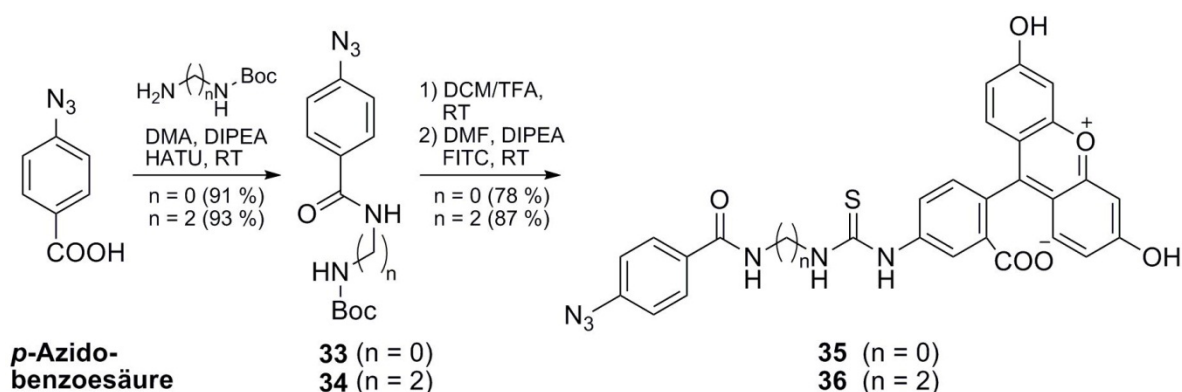
Eintrag	Retentionszeit [min]	Massenshift [m/z]	Lösemittel
1	2.10	– 658	H ₂ O ^a
2	2.30	– 389	H ₂ O ^a
3	2.62	– 60	H ₂ O ^{a,b} , H ₂ O/MeCN
4	2.70	– 43	H ₂ O ^{a,b} , H ₂ O/MeCN
5	2.89	– 28	H ₂ O ^{a,b} , H ₂ O/MeCN
6	3.24	– 28	H ₂ O ^b , H ₂ O/MeCN
7	3.40	– 28	H ₂ O ^{a,b} , H ₂ O/MeCN
8	3.62	– 18	- ^c

^a entgaste Lösung unter Argon, ^b nicht entgast, ^c Cyclisierungsprodukt **22** (schon vorher vorhanden gewesen)

Die Produkte Nr. 1 und 2 bildeten sich interessanterweise ausschließlich in Abwesenheit von Sauerstoff in einer entgasten wässrigen Lösung. Das Produkt Nr. 1 weist einen Massenshift von – 658 m/z zum Ausgangsmaterial (Scaffold **24**) auf und lässt sich ohne Strukturaufklärung nicht erklären. Der Masse nach ist Produkt Nr. 2 ein Scaffold bei dem das Fluorescein abgespalten wurde. Dies wurde auch durch das UV-Spektrum dieser Verbindung (hier nicht gezeigt) untermauert, da die charakteristische Fluoreszenzbande nicht mehr vorhanden war. Die Produkte 3 – 5 konnten in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander bei allen drei Bedingungen detektiert werden. Bis auf Nr. 5 mit einer normalen Massendifferenz von –28 m/z, was der Abspaltung von molekularem Stickstoff entspricht, lassen sich diese Massen ebenfalls nicht erklären. Produkt 6 ist nur in wässrigen Lösungen zu beobachten die nicht entgast worden sind und besitzt eine für Azide erwartete Massendifferenz von ebenfalls –28 m/z. Produkt Nr. 7 ist oft als Doppelpeak zu beobachten weist ebenfalls auf eine Verbindung hin, dass um 28 g/mol leichter ist. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei dem Doppelpeak um fast identische Verbindungen handelt, die beide eine Massendifferenz von –28 m/z zum Ausgangsmaterial besitzen. Produkt Nr. 8 bezeichnet das Cyclisierungsprodukt **22**, das schon vor der Bestrahlung vorhanden gewesen ist.

Aus den bis jetzt erhaltenen Ergebnissen lässt sich sagen, dass das Vorhandensein von Protonen von großer Bedeutung für die erfolgreiche Aktivierung des Azides über den Fluorophor ist. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des Abstandes zwischen dem Fluorophor und dem Azid wie auch die Empfindlichkeit unterschiedlicher Azide untersucht. Dazu wurden verschiedene Modellverbindungen synthetisiert und unter den zuvor

beschriebenen Bedingungen bestrahlt. Parallel dazu wurden diese Verbindungen auch im Rahmen einer Kooperation mit der physikalischen Chemie der Universität Potsdam dort laserspektroskopisch analysiert.



Schema 17: Synthese der Modellverbindungen mit Hydrazin bzw. Ethylendiamin-Linker

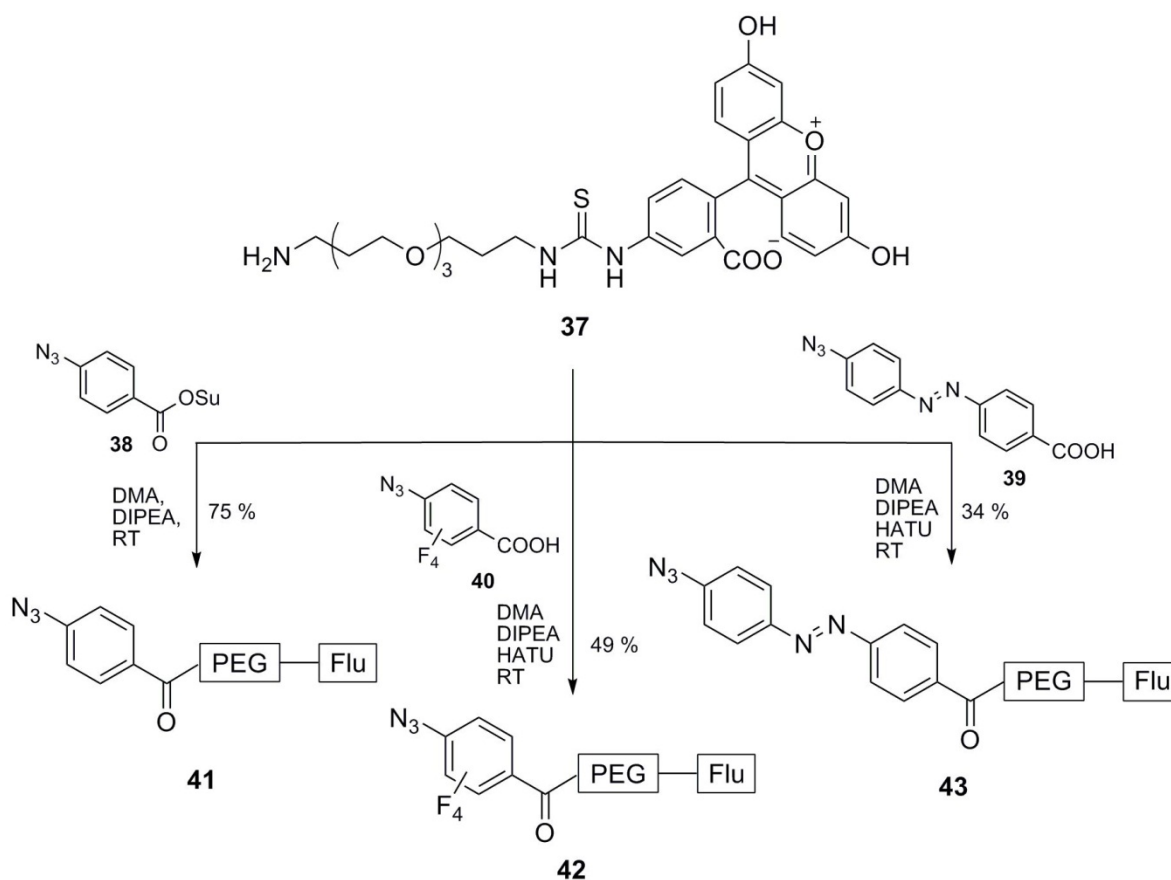
Schema 17 zeigt die Synthese von zwei Modellverbindungen **35** und **36** mit kurzem und mittlerem Abstand zwischen dem aromatischen Azid und dem Fluorescein. Dazu wurde Hydrazin bzw. Ethylendiamin als Linker verwendet, welche als mono-Boc-geschützte Amine kommerziell erhältlich waren. Diese wurden mit p-Azidobenzoessäure unter Standardbedingungen in guten bis sehr guten Ausbeuten zu den Modellverbindungen **35** und **36** umgesetzt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Reaktionen wie auch die isolierten Verbindungen weitestgehend vor Licht geschützt wurden.

Für einen längeren Abstand wurde ein Polyethylenglykoldiamin(PEG)-Linker verwendet. Dazu wurde vom bekannten Fluoresceinderivat **37**^[71] ausgegangen. Diese gestattete die Darstellung der Modellverbindungen **41**, **42** und **43** mit unterschiedlichen Aziden in einer Stufe (Schema 18). Bis auf die Synthese der Modellverbindung **41** erfolgte die Synthese mit HATU/DIPEA. Bei **41** wurde der schon vorhandene NHS-Ester **38** verwendet, somit waren weitere Kupplungs-reagenzien nicht notwendig. Obwohl die Ausbeuten der beiden Verbindungen **42** u. **43** unbefriedigend waren, wurde nicht an einer Optimierung gearbeitet. Es wurde ausreichend Material für weitere Untersuchungen synthetisiert.

Die anschließenden Bestrahllexperimente wurden in Wasser (pH = 7.5 – 8, $c = 50 \mu\text{M}$, $T = 1 - 4 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die Analyse erfolgte ausschließlich durch HPLC-MS. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. Es wurde gefunden, dass der Abstand zwischen dem aromatischem Azid und dem Fluorescein eine entscheidende Rolle beim Energietransfer spielt, was zusätzlich für einen intramolekularen Prozess des Energietransfers spricht. Eine Verkürzung des Linkers zwischen den beiden funktionellen Gruppen führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Anregung des Azides. So war bei der

3 Ergebnisse

Verwendung von Hydrazin als kürzesten Linker nach 20 min noch ca. 50 % des Ausgangsmaterials detektierbar.



Schema 18: Synthese der Modellverbindungen mit unterschiedlichen Aziden

Beim dem etwas längeren Ethylendiamsubstrat **36** war erst nach 10 min kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden. Dagegen war bei **41** (langer Abstand) nach 2 min fast kein Edukt mehr vorhanden. Es wurden zwar noch geringe Spuren des nicht reagierten Eduktes **41** nachgewiesen, jedoch beträgt der Umsatz min. 90%. Bei einem intermolekularen Energietransfer wäre zu erwarten, dass der unterschiedliche Abstand sich nicht so deutlich auf die Reaktivität der Verbindungen auswirkt. Dies war jedoch nicht der Fall. Bei den Modellverbindungen, die bei einer konstanten Linkerlänge unterschiedliche Azide besitzen (**41**, **42** u. **43**) waren die erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 18) etwas überraschender. Obwohl alle Azide annähernd denselben Abstand zum Fluorescein besitzen, kam es zu signifikanten Unterschieden in der Empfindlichkeit gegenüber Licht der Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$. So reagiert das Tetrafluorderivat **42** 10x langsamer ab als das Azid **41**. Das Abreagieren war auch optisch durch eine Farbveränderung der Lösung zu erkennen. So wurde aus einer fluoreszierend gelben Lösung schon nach 1 min eine orange Lösung. Weiter war auch die Stabilität der Azo-Verbindung **43** erstaunlich. Obwohl der azidtragende Aromat gegenüber

den herkömmlichen Azid in **41** kaum verändert wurde, konnte über eine Bestrahlungsdauer von 20 min keinerlei Abbau festgestellt werden.

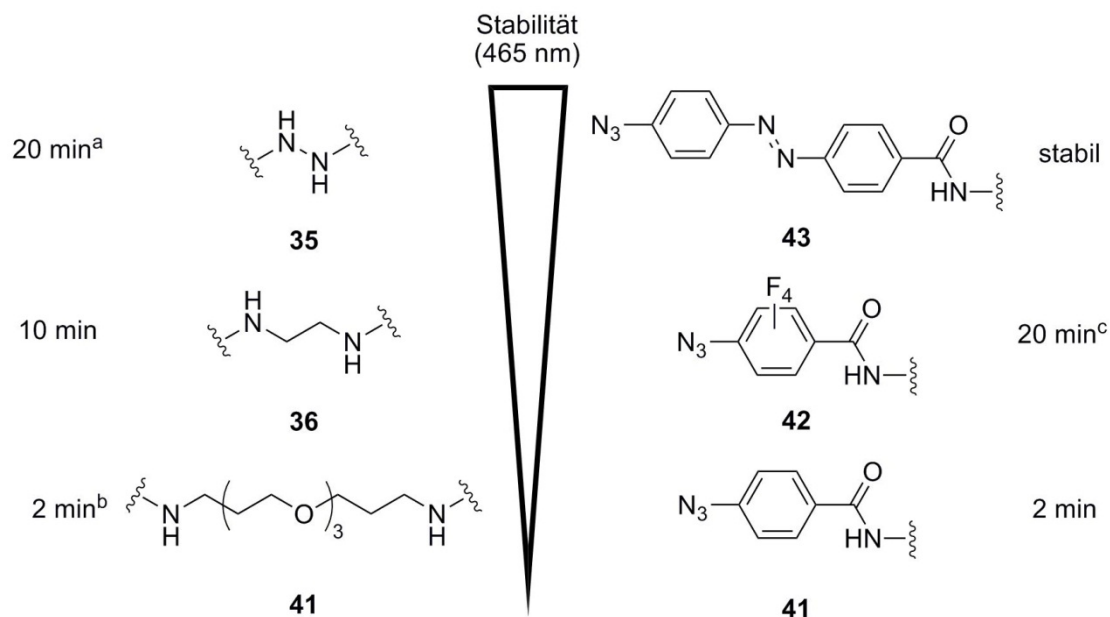
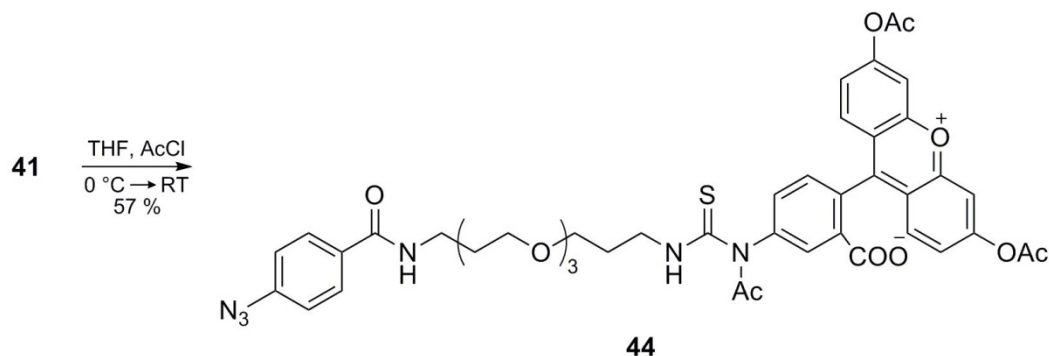


Abbildung 18: Abhängigkeit der Azidaktivierung von der Linkerlänge und dem Azid
nach 20 min Bestrahlung noch 50 % **35** vorhanden, ^b es waren nur noch geringe Spuren **41** detektiert, nach 5 min war kein Edukt mehr detektierbar, ^c nach 20 min war kein Edukt mehr detektierbar

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wahl des Azides in Verbindung mit der Linkerlänge zwischen Azid und Fluorescein die Empfindlichkeit der Verbindung gegenüber 465 nm stark beeinflusst. So wurden unter denselben Bedingungen die unterschiedlichsten Stabilitäten ermittelt.

In Zusammenarbeit mit der Uni Potsdam sollte noch abschließend eine Modellverbindung dargestellt werden, in der das Fluorescein kein acides Proton mehr besitzt. Dadurch sollte der Einfluss von Protonen auf den Energietransfer von Fluorescein auf das Azid weiter untersucht werden. Dazu wurden die phenolischen OH-Gruppen acetylgeschützt (Schema 3.8).



Schema 19: Synthese eines acetylierten Fluorescein-Derivates

Eine gezielte Acetylierung der beiden phenolischen Gruppen gelang nicht, da die vollständige Acetylierung der Phenole zu Überacetylierungen führte. Das erhaltene Hauptprodukt besaß drei Acetylgruppen, wobei die dritte den Thioharnstoff acetyliert hat, was durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt wurde. Das erhaltene Produkt konnte nicht 100 %ig von dem zweifach acetylierten Produkt abgetrennt werden. Diese Verunreinigung (ca. 20%) wurde für die anschließenden Stabilitätsuntersuchungen akzeptiert, da das Hauptprodukt eindeutig im HPLC-MS-Spektrum identifizierbar war. Die anschließend durchgeführten Bestrahlungen der Verbindung **44** unter den oben beschriebenen Bedingungen zeigten, dass sie stabil gegenüber der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 465 nm ist. Dass die phenolischen Protonen sehr wichtig für die Fluoreszenzeigenschaften sind, war auch optisch erkennbar. Während der Synthese entfärbte sich die Reaktionslösung, bis sie nur noch schwach gelb gefärbt war und das isolierte Produkt wies ebenfalls nur eine schwache Gelbfärbung auf. Diese Löschung der Fluoreszenz durch Substituierung der phenolischen Gruppen ist literaturbekannt und wird auch bei der fluoresceinbasierten Detektion von Quecksilber ausgenutzt^[72].

3.1.5 Kapazität von Antikörper beschichteten Magnetbeads

Parallel zur Synthese von fluoreszierenden Capture Compounds wurden Magnetbeads von der Hydrotec GmbH mit dem anti-Fluorescein-Antikörper B13-DE1^[64] beschichtet, um eine Isolierung der spezifischen Proteine zu ermöglichen. Um die Kapazität dieser Magnetbeads zu bestimmen, wurde eine Titration der Beadsuspension mit einer Fluorescein-Lösung durchgeführt. Über die Differenz der UV-Vis-Absorptionen und fortlaufender Titration mit Fluorescein ergaben sich folgende Geraden, deren Schnittpunkt die Bindungskapazität der beschichteten Magnetbeads darstellt:

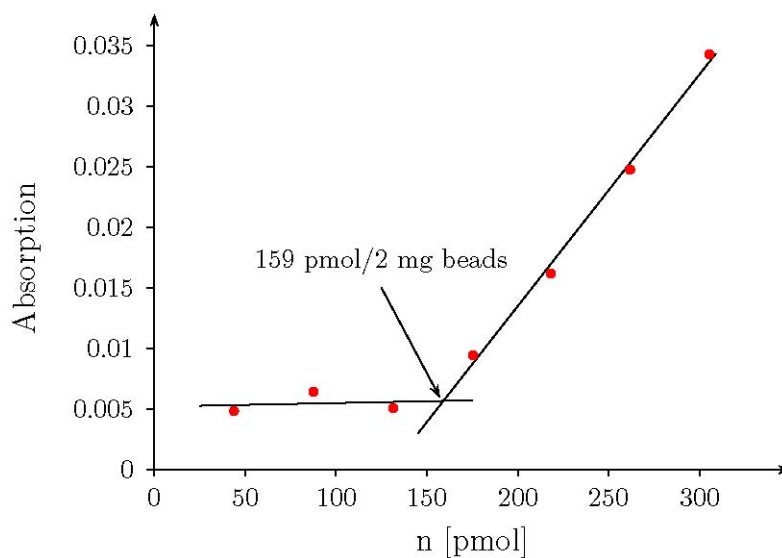


Abbildung 19: Bestimmung der Kapazität von anti-Fluorescein-Antikörper beschichteten Magnetbead

Mit einer Bindungskapazität von 80 pmol/mg Beads besaßen die antikörperbeschichteten Beads eine deutlich geringere Kapazität als die Straptavidinbeads (2.5 – 7 μ mol/mg Beads). Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Antikörper wesentlich größer als Streptavidin sind und dadurch allein aus sterischen Gründen eine geringere Beladung der Beads erreicht werden kann. Dies lässt eine verminderte Effektivität bei der Isolierung von Fluorescein-CCs mit Antikörper beschichteten Magnetbeads vermuten.

3.1.6 Fluoreszenzmarkierung von Zielproteinen

Erste Versuche in der Abteilung Biochemie zeigen, dass aufgrund der geringen Bindungskapazität der Antikörperbeads eine Isolierung der Zielproteine nur unzureichend machbar ist. Davon unabhängig lassen sich jedoch Proteine spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Dabei wurden mit unterschiedlicher Konzentration an Fluorescein-CC **30** in *E.coli* SAH-bindene Proteine fluoreszenzmarkiert.

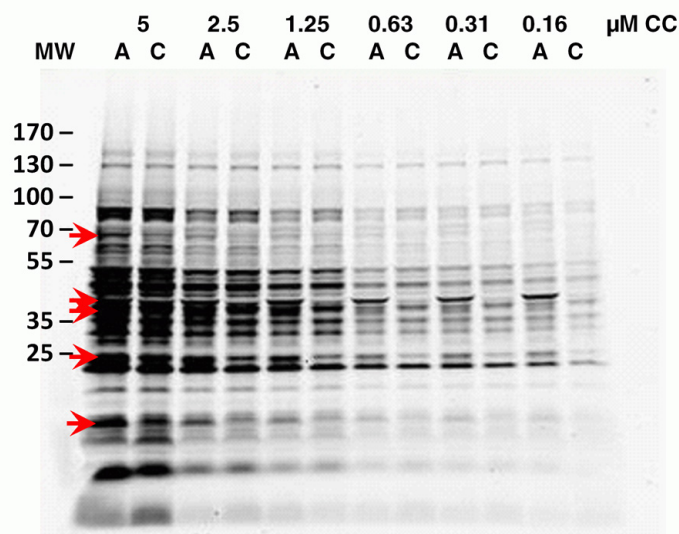


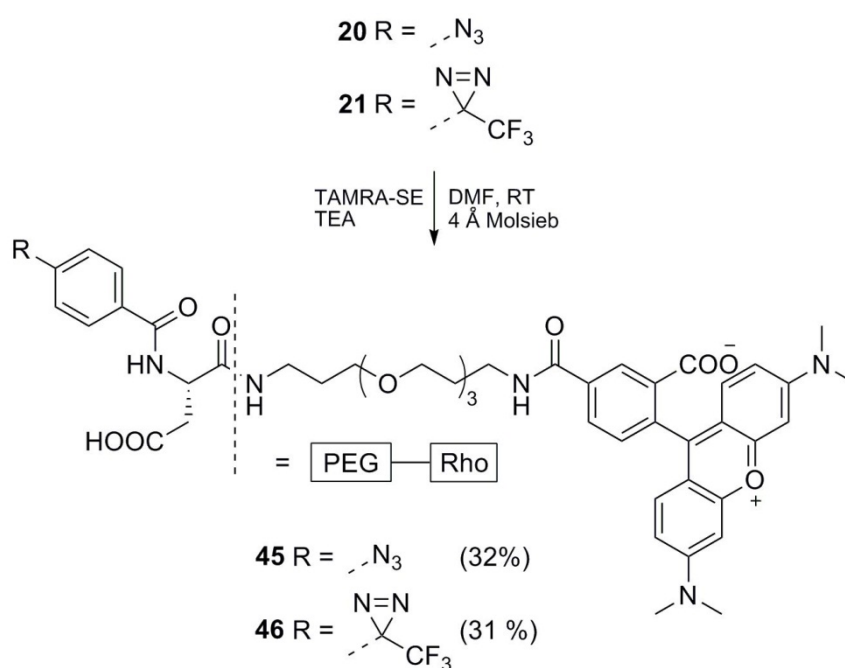
Abbildung 20: Selektive Fluoreszenzmarkierung von SAH-bindenden Proteinen in *E.coli*

A: Ansatz C: Kompetition, MW in kDa

Dargestellt ist ein SDS-PAGE, bei dem ausschließlich fluoreszierende Proteine mittels eines Typhoon Fluoreszenz Scanners detektiert wurde. Die Pfeile markieren die spezifischen Banden, die als Differenzbanden im Ansatz im Vergleich zu Kompetitionsexperimenten gefunden wurden. Bei einem Kompetitionsexperiment wird noch vor der Zugabe an Capture Compound freies SAH in das Zelllysate hinzugegeben, um die Bindungstaschen der SAH-bindenden Proteine zu blockieren. Diese sind somit nur im Ansatz detektierbar, was eine Differenzierung zwischen unspezifischem Hintergrund und spezifischen Zielproteinen ermöglicht.

3.1.7 Rhodamin-Scaffolds und Capture Compounds

Für die Synthese der Rhodamin Scaffolds mit TAMRA als Fluorophor wurden die Amine **20** und **21** analog zum Schema 13 mit TAMRA-NHS in DMF umgesetzt. Trotz der Zugabe von aktiviertem 4 Å Molsieb bei der Synthese von **46** konnte die Hydrolyse des NHS-Esters nicht unterdrückt werden. Die isolierte Ausbeute der Scaffolds lag bei 31 bzw. 32% (Schema 20). Aufgrund der immer sehr geringen Mengen an benötigter Substanz für die späteren biochemischen Experimente waren die erhaltenen Mengen für Photostabilitätsuntersuchungen und weiterer Synthesen ausreichend.



Schema 20: Synthese der Rhodamin Scaffolds

Wie im Kapitel 3.1.4 beschrieben, besitzen die Fluorescein Scaffolds eine sehr unterschiedliche Photochemie, bei der sich aromatische Azide über das selektive Bestrahlen des Fluorophors anregen lassen. Der bei **45** und **46** verwendete Rhodaminfarbstoff besitzt eine fast identische Grundstruktur bezüglich des Fluorophors (anstelle der Phenole, *N,N'*-Dimethyamingruppen). Insbesondere wegen der Abwesenheit der aciden phenolischen Protonen war es wichtig zu untersuchen, ob die Rhodamin-Scaffolds ebenfalls einen Energietransfer vom Fluorophor zum Azid aufweisen. Deshalb wurden die Scaffolds **46** und **45** auf die diesbezügliche Eigenschaft hin untersucht, bevor entsprechende Capture Compounds synthetisiert wurden. Die Scaffolds wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen mit Laserlicht der Wellenlänge 532 nm ($P \leq 5$ mW) eines kommerziell erhältlichen Laserpointers bestrahlt und die Lösungen anschließend mit Hilfe der HPLC-MS

3 Ergebnisse

untersucht. Die emittierte Wellenlänge entspricht zwar nicht exakt dem Absorptionsmaximum von TAMRA (Abbildung 21), jedoch haben die Untersuchungen der Fluorescein Scaffolds belegt, dass dies nicht notwendig ist.

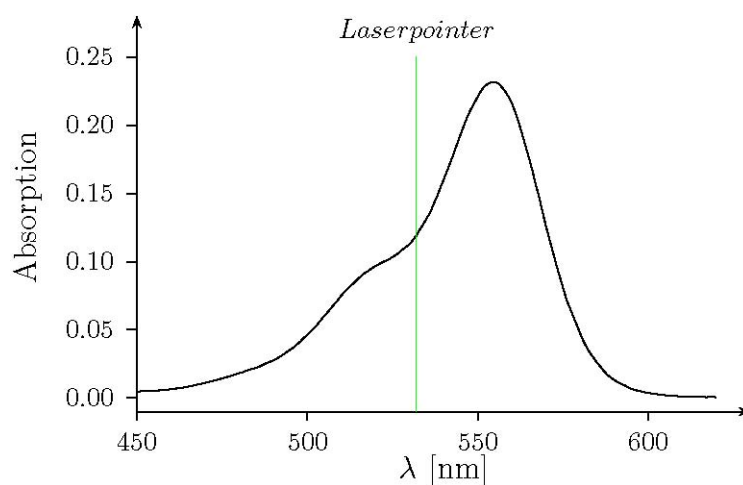
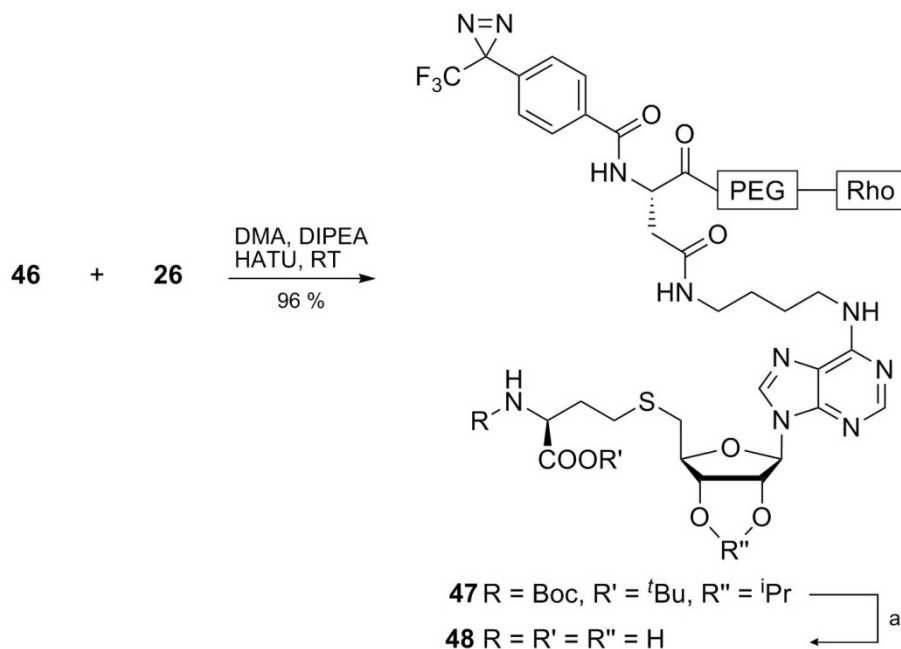


Abbildung 21: Vergleich Laseremission und TAMRA-Absorption

Bei den Scaffolds **45** und **46** wurde ein identisches Verhalten wie bei den Fluorescein-Scaffolds festgestellt. Es kam trotz der Abwesenheit von den, beim Fluorescein so wichtigen, phenolischen Protonen zu einem Abreagieren des aromatischen Azides, wohingegen das Diazirin keine Reaktion zeigte.



Schema 21: Synthese der Rhodamin SAH Capture Compound

a: DCM, 25 Äquiv. H₂O, – 20 °C, 100Äquiv. 4M HCl in Dioxan, über Nacht, 46%

Daraufhin wurde nur mit dem Diazirin als Reaktivitätsfunktion weiter gearbeitet und die Capture Compound nach Schema 21 aufgebaut. Die Kupplung verlief analog der Fluorescein-CC **28**, jedoch mit wesentlich verbesserter Ausbeute. Es wurden 96 % an Verbindung **47** isoliert. Entscheidend konnte auch die Ausbeute im Hydrolyseschritt verbessert werden. Die Dioxan-HCl-Lösung wurde vor Zugabe bereits auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und dann gekühlt in die Reaktion geben. Eine Spaltung der glycosidischen Bindung konnte während der Reaktion nicht beobachtet werden. Des Weiteren wurde die überschüssige Säure mit einem Überschuss an Triethylamin ebenfalls in der Kälte gequenchet ohne vorher den Großteil unter vermindertem Druck zu entfernen. Obwohl bei der Reinigung des Produktes **48** auch noch das Spaltungsprodukt isoliert werden konnte, lag die Ausbeute an Capture Compound mit fast 50 % deutlich höher als bei dem bisherigen Synthesenverfahren. Eine Bestimmung der Bindungskapazität der Antikörpermagnetbeads wurde aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.1.8 Zusammenfassung

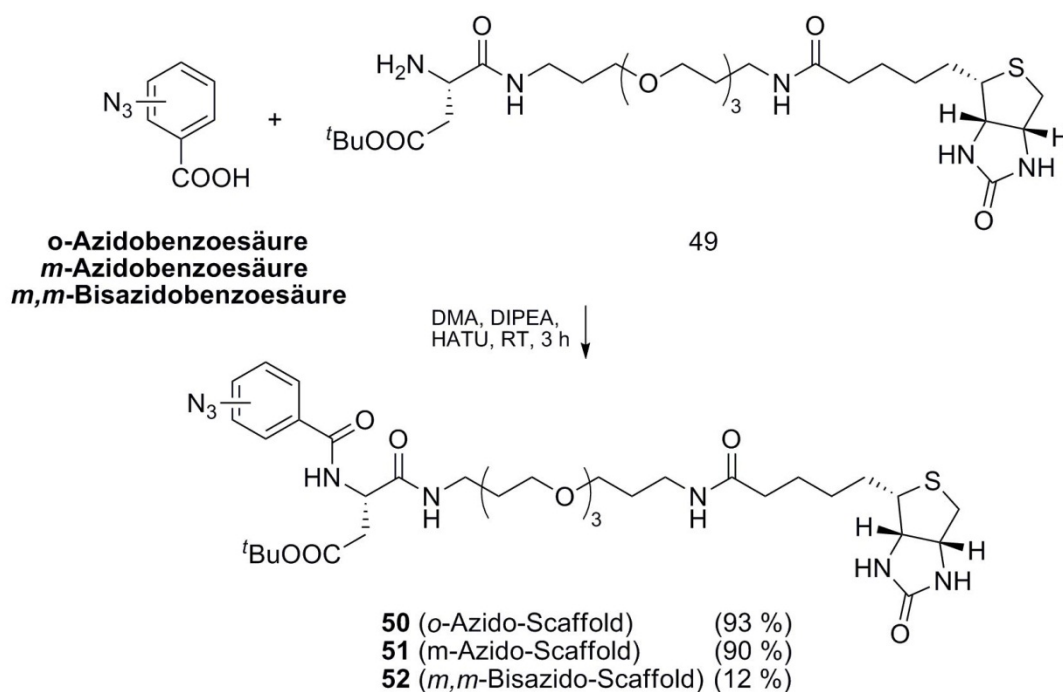
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine fluorophortragende Capture Compound ein Subproteom spezifisch markieren kann. Eine Isolierung dieser markierten Proteine mittels antikörperbeschichteter Magnetbeads gelingt nicht zuverlässig. Aufgrund der Größe der benötigten Antikörper kann keine ausreichend hohe Kapazität der Beads erreicht werden, was dazu führt, dass Fluorophore-Antifluorophor-Antikörper keinen gleichwertigen Ersatz zum Biotin-Straptavidin System darstellen. Der Vorteil gegenüber den herkömmlichen Capture Compounds, nämlich einer selektiven Fluoreszenzmarkierung, wird davon jedoch nicht beeinflusst. Weiter können über das selektive Bestrahlen beider eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe, die als Reaktivitätsfunktion verwendeten aromatischen Azide aktiviert werden, wohingegen die ebenfalls verwendeten aromatischen Diazirine keine diesbezügliche Empfindlichkeit aufweisen. Dies eröffnet die Möglichkeit, Capture Compounds Selektivitätsfunktionen aufzubauen, die unter den Standardbestrahlbedingungen ($\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$) nicht ausreichend stabil sein würden. Diese könnte bei energiereichem UV-Licht abbauen. Dadurch wäre eine spezifische Wechselwirkung mit dem Zielprotein und dessen Isolierung nicht möglich. weiterführende Untersuchungen zum Mechanismus des Energietransfers zwischen Fluorophor und einem aromatischen Azid finden zurzeit noch in der physikalischen Chemie der Uni Potsdam statt.

3.2 Einfluss der unterschiedlichen Positionierung der Azidfunktion

Im folgenden Kapitel wird beschrieben, welchen Einfluss die Anzahl und die Position der photolabilen Gruppe(n) auf das Captureverhalten besitzt. Dies wurde anhand von aromatischen Aziden untersucht, in denen die Azidfunktion an verschiedenen Positionen des Aromaten angeknüpft ist. Aufgrund der großen Expertise in der Abteilung Biochemie im Umgang mit cAMP-Capture Compounds^[11], wurde in allen Fällen cAMP als Selektivitätsfunktion verwendet. Dies erleichterte die Bewertung der erhaltenen biochemischen Ergebnisse.

3.2.1 Synthese *o*- und *m*-Azido bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffold

Die Synthese des herkömmlichen *p*-Azido-Scaffolds erfolgte nach der literaturbekannten Vorschrift^[12] und wird im Weiteren nicht diskutiert. Bei der Synthese von *o*- und *m*-Azido bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffolds wurde von einer geeigneten Scaffoldvorstufe, dem sog. Open Scaffold **49** ausgegangen. Dies ermöglicht den Aufbau von Scaffolds mit verschiedenen Reaktivitätsfunktionen in einer Stufe.



Schema 22: Synthese der *o*-, *m*- und *p*-Azido- bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffolds

Die Synthese der benötigten Azidobenzoessäuren erfolgte aus den entsprechenden Aminobenzoessäuren^[73, 74]. Jedoch gelang die Synthese der *m,m*-Bisazidobenzoessäure nur

unzureichend. Das erhaltene Rohprodukt ließ sich nicht über Chromatographie oder Umkristallisation reinigen und wurde im folgenden Reaktionsschritt ungereinigt eingesetzt. Die Amidbindung erfolgte über eine Säureaktivierung mittels HATU (Schema 22). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substanzen wurden darauf geachtet, dass die Reaktion und die sich anschließenden Schritte der Reinigung und Analyse, so weit wie möglich und praktikabel, unter Lichtausschluss erfolgten. Nach beendeter Reaktion und Entfernung des Lösemittels wurde der erhaltene Rückstand ohne weitere Aufarbeitung über eine MPLC gereinigt. Bis auf das *m,m*-Bisazido-Scaffold **52** (12 %) gelang dies mit Ausbeuten von $\geq 90\%$. Der Grund für die schlechte

Ausbeute von **52** lag daran, dass das Edukt nicht rein eingesetzt werden konnte. Durch die Verunreinigungen der *m,m*-Bisazidobenzoesäure musste die chromatographische Reinigung mehrmals durchgeführt werden, da das erhaltene Produkt nach der ersten Reinigung nur von unzureichender Reinheit (max. 70 %) war. Trotz der geringen Ausbeute von 12% war die erhaltene Menge für sämtliche Experimente und die Synthese einer Capture Compound ausreichend. Dies erleichterte die Bewertung der erhaltenen biochemischen Ergebnisse.

3.2.2 Vergleich von UV-Spektren & Photostabilität

Es ist OC1-Wissen, dass die Positionierung eines Substituenten am Aromaten dessen Reaktivität gegenüber anderen funktionellen Gruppen stark beeinflusst. Ebenso kann die Position der Azidgruppe (Abbildung 22) am Aromaten dazu führen, dass sich das photochemische Verhalten der einzelnen aromatischen Azide deutlich voneinander unterscheidet.

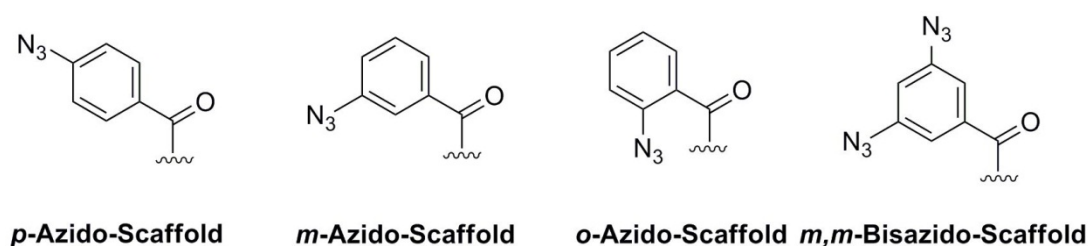


Abbildung 22: Reaktivitätsfunktion im *o*-, *m*- und *p*-Azido- bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffold

Die effiziente Photoaktivierbarkeit ist von wesentlicher Bedeutung für die spätere Anwendung als Capture Compound in biochemischen Experimenten. Deswegen wurden von allen dargestellten Scaffolds UV-Absorptionsspektren aufgenommen. Die Messungen wurden in Quarzküvetten durchgeführt. Der Vergleich der neuen Scaffolds mit dem schon verwendeten *p*-Azido-Scaffold war dabei sehr interessant. Die nach dem Abzug der

3 Ergebnisse

Hintergrundabsorption des Wassers erhaltenen Spektren (Abbildung 23) zeigen die unterschiedlichen elektronischen Verhältnisse der Aromaten. Die einzelnen Spektren sind von unterschiedlicher Komplexität und die Absorptionsmaxima sind stark zueinander verschoben.

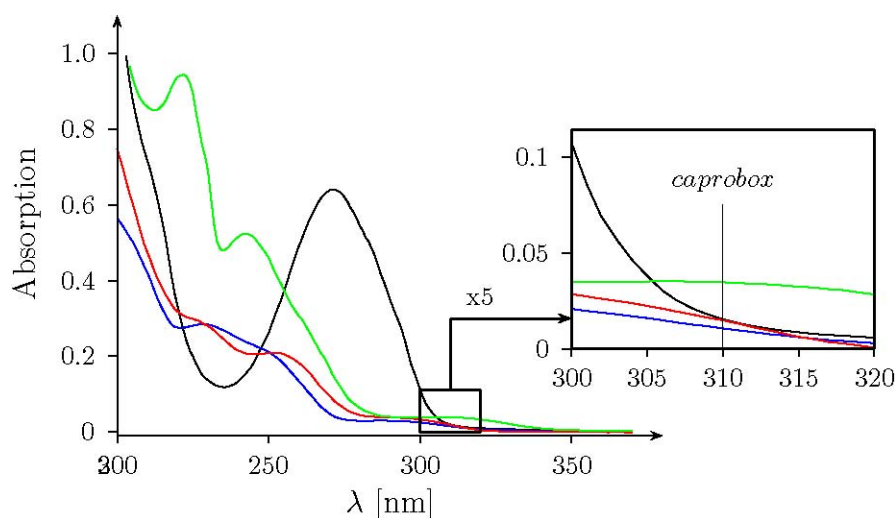


Abbildung 23: UV-Spektren vom *o*-, *m*- und *p*-Azido- bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffolds
 $c = 20 \mu\text{M}$, schwarz: *p*-Azido-Scaffold, rot: *o*-Azido-Scaffold, blau: *m*-Azido-Scaffold, grün: *m,m*-Bisazido-Scaffold

Betrachtet man den kürzerwelligem UV-Bereich von $\leq 300 \text{ nm}$ sind die auftretenden Unterschiede am deutlichsten. Einzig das *o*- (rot) und *m*-Azido-Scaffold (blau) weisen eine ähnliche UV-Absorption auf. Für die Verwendung der jeweiligen Verbindungen im biochemischen Experiment sind diese Unterschiede jedoch nicht relevant, da das Emissionsmaximum des in der caproBox verwendeten UV-Lichtes bei 310 nm liegt. Bei der Verwendung von kürzerwelligem Licht erhöht sich einerseits die Gefahr einer Schädigung der biologischen Probe und andererseits absorbiert diese Probe mehr UV-Licht geringerer Wellenlänge, was eine effektive Aktivierung des Azides verhindert. Bei 310 nm ist die Absorption von allen Reaktivitätsfunktion fast identisch (Abbildung 23, kleiner Kasten). Einzig das *m,m*-Bisazido-Scaffold weist eine etwas höhere Absorption als die anderen Scaffolds auf. Dadurch könnte es zu einer schnelleren Anregung dieses Azides bei 310 nm kommen, was von Vorteil wäre. Alle Scaffolds unterscheiden sich unterhalb von 310 nm in ihrer UV-Absorption, die bei 310 nm , der Anregungswellenlänge, jedoch fast identisch ist. Somit sollten sich alle Scaffolds in der caproBox in vergleichbarer Zeit aktivieren lassen. Die Abblitzstudien wurden nach dem Vorbild des *p*-Azido-Scaffolds durchgeführt, dass schon vorher auf sein Abblitzverhalten hin untersucht wurde (Abbildung 24). Die Konzentration der verwendeten wässrigen Lösungen lag bei $25 \mu\text{M}$. Diese, gegenüber den UV-Messungen erhöhte Konzentration, wurde gewählt um eine ausreichend hohe Konzentration für die, sich

3 Ergebnisse

an die HPLC-Trennung anschließende massenspektrometrische Analyse, zu gewährleisten. Die gezeigten UV-Chromatogramme der HPLC-MS-Läufe beziehen sich alle auf die UV-Absorption bei 254 nm. Es ist davon auszugehen, dass die einzelnen Reaktionsprodukte unterschiedliche Extinktionskoeffizienten besitzen. Dadurch kann aus den Verhältnissen der Peaks zu einander nicht auf die Verhältnisse der entstandenen Photolyseprodukte zueinander geschlossen werden. Abbildung 24 zeigt einen Ausschnitt der übereinander gelegten UV-Chromatogramme der erhaltenen HPLC-MS-Läufe nach Belichtung des *p*-Azido-Scaffolds. Das Belichtungsexperiment

wurde in der caproBox durchgeführt und die Proben anschließend in Braunglasprobengläschen für die HPLC-MS-Analyse überführt. Um Verfälschungen der Ergebnisse zu minimieren, wurden diese Proben noch zusätzlich durch Alufolie bis zur Messung vor Licht geschützt. Länger als 20 min wurde nicht bestrahlt, da ein typisches Capture Experiment nicht länger als 10 min bestrahlt wird. Somit sind eventuell auftretende, photoinduzierte Folgereaktionen nach bsp. 30 bzw. 60 min irrelevant.

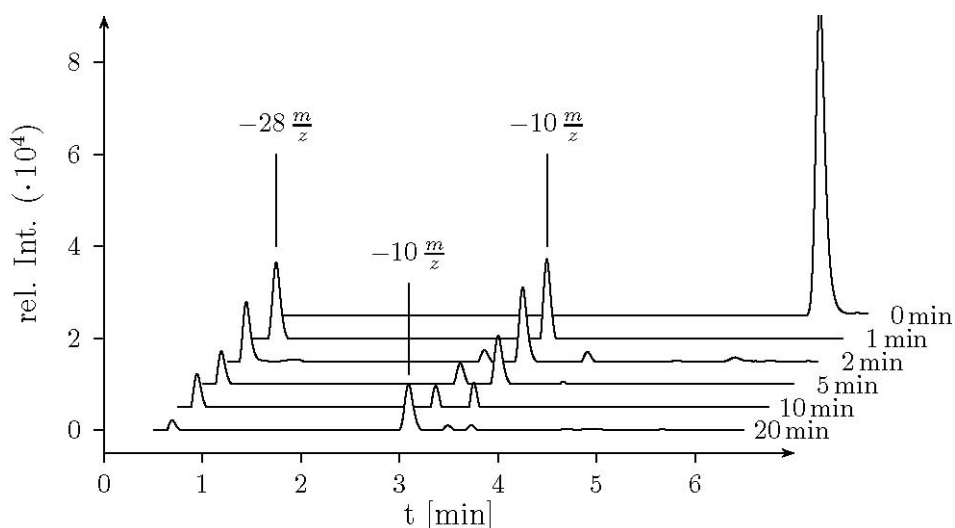


Abbildung 24: Ablitzstudie *p*-Azido-Scaffold

$T = 1 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Bestrahlungsdauer: 0 – 20 min,

$\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$, $V=100\text{ }\mu\text{l}$

Das Scaffold wurde als freie Säure eingesetzt und ist bereits nach 1min Bestrahlung vollständig zugunsten von zwei Photolyseprodukten mit einem unterschiedlichen Massenshift zum Edukt (Abbildung 24) abgebaut. Bei dem Peak bei 0.69 min handelt sich um ein primäres Photolyseprodukt mit einem Massenshift von -28 m/z zum Ausgangsmaterial, das sich nach der Abspaltung von molekularem Stickstoff (-28 g/mol) in Folge einer intramolekularen Umlagerungsreaktion gebildet haben muss. Ein Nitren ist nicht annähernd stabil und langlebig genug, um in einem HPLC-MS-Lauf detektiert werden zu können. Beim

3 Ergebnisse

zweiten, ebenfalls einem primären Photolyseprodukt (3.49 min), kam es nach der Abspaltung von Stickstoff zur Anlagerung von Wasser (+ 18 g/mol), was zu einem Massenshift von insgesamt -10 m/z führte. Beide Photolyseprodukte reagierten innerhalb der Bestrahlungsdauer von 20 min annähernd zugunsten eines sekundären Photolyseproduktes ab, dass ebenfalls einen Massenshift von -10 m/z aufwies. Dieses Produkt konnte bereits nach 2 min Bestrahlungsdauer beobachtet werden (Abbildung 24). Alle drei detektierten Photolyseprodukte sind bei Betrachtung der photoinduzierten Folgereaktionen von aromatischen Aziden (Schema 3 und 1.4) zu erwartende Produkte.

In den UV-Chromatogrammen der bestrahlten Proben (Abbildung 24) wurden zu den identifizierten Produkten auch Nebenprodukte detektiert, die ohne Strukturaufklärung nicht identifiziert werden konnten. Um einen möglichen Einfluss der Carbonsäure zu eliminieren, wurden bei den folgenden Scaffolds die Vorstufen des kupplungsfähigen Scaffolds, die *tert*-Butylester, verwendet.

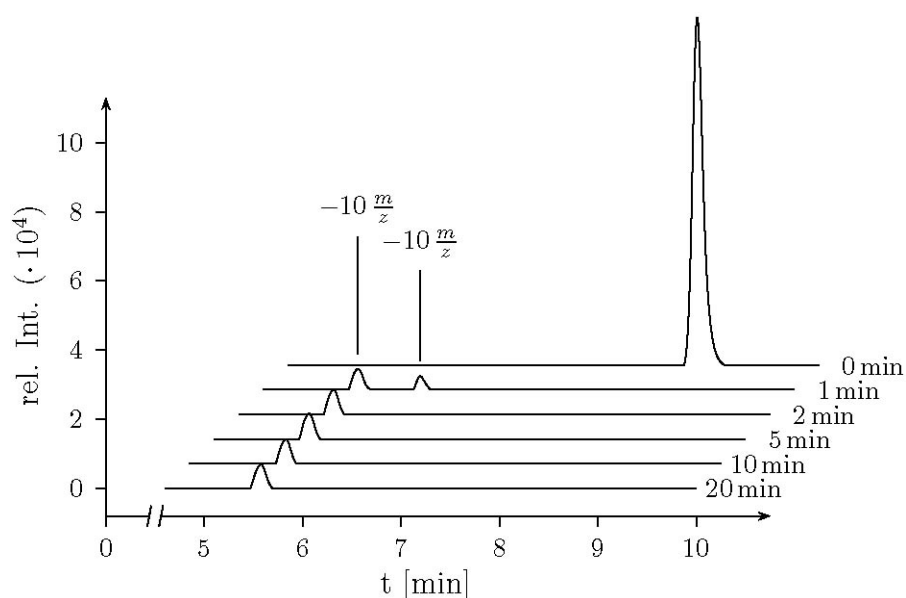


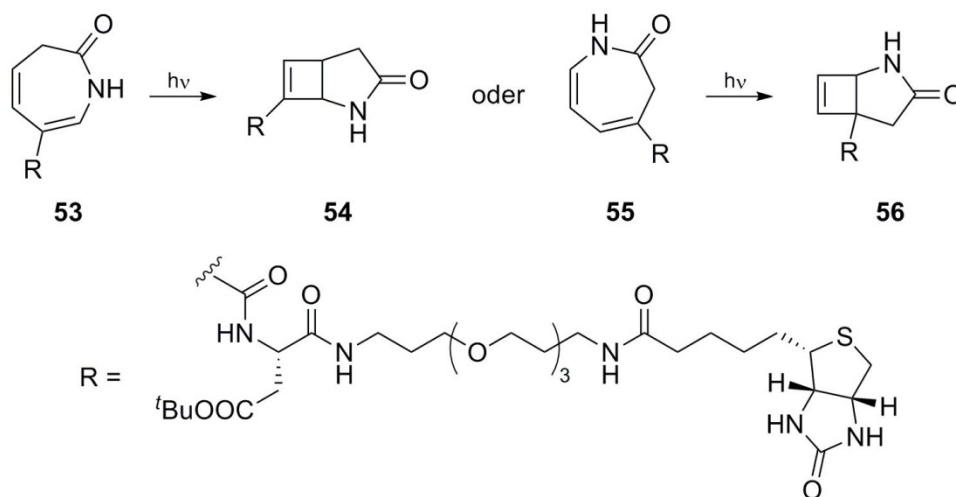
Abbildung 25: Abblitzstudie *m*-Azido-Scaffold

$T = 1 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Bestrahlungsdauer: 0 – 20 min

$\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$, $V = 100\text{ }\mu\text{l}$

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Bestrahlung des *m*-Azido-Scaffolds **51** wurde im Gegensatz zum *p*-Azido-Scaffold kein Produkt mit einem Massenshift von -28 m/z gefunden. Das eingesetzte *m*-Azido-Scaffold reagierte aber auch hier innerhalb der ersten Minute vollständig ab (Abbildung 25).

Zu beobachten waren nur zwei Photolyseprodukte, die beide eine Massendifferenz von -10 m/z in Bezug auf das eingesetzte Scaffold **51** aufwiesen (Abbildung 25). Auch beim *m*-Azido-Scaffold zeigte sich, dass die Produkte unterschiedlich schnell gebildet wurden, wobei



Die photolytische Bildung ähnlicher Bicyclen wurde bereits vor 50 Jahren beschrieben^[18, 19] und auch anhand von NMR-Daten isolierter Abblitzprodukte des para-Azido-Scaffolds belegt. Im Rahmen der Photostabilitätsuntersuchung des meta-Azido-Scaffolds **51** wurde jedoch nur ein stabiles Photolyseprodukt beobachtet. Somit muss die Bildung eins der beiden in Schema 23 beschriebenen Lactame so stark zugunsten des anderen Lactams zurückgedrängt sein, dass dieses nicht mehr beobachtet werden konnte.

53

3 Ergebnisse

ionisierte und kein Massensignal gab. Ein vollständiger Abbau des eingesetzten *o*-Azido-Scaffoldes konnte nach 2 min Bestrahlung detektiert werden.

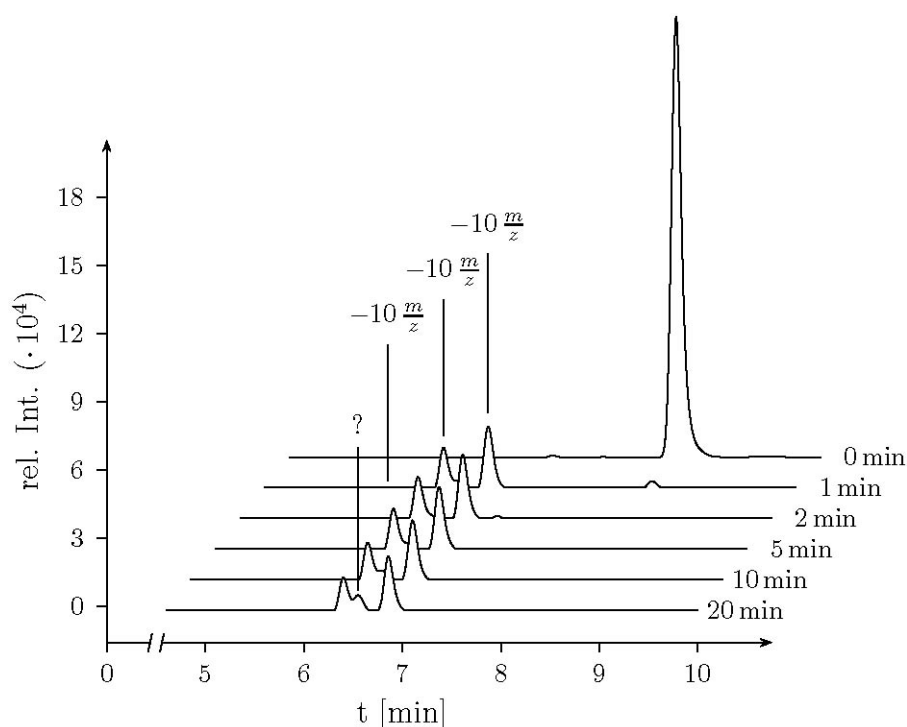


Abbildung 26: Abblitzstudie *o*-Azido-Scaffold

$T = 1 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Bestrahlungsdauer: 0 – 20 min

$\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$, $V = 100\text{ }\mu\text{l}$

Bei der Bestrahlung des *m,m*-Bisazido-Scaffoldes **52** sollten durch die zweite Azidgruppe mehr photoinduzierte Folgereaktionen möglich sein. Es wurde daher die Bildung eines komplexen Produktgemisches erwartet. Allein bei der Betrachtung möglicher Massendifferenzen durch Stickstoffabspaltung und ggf. Wasseraddition sind fünf Produkte mit folgenden Massendifferenzen zum Ausgangsmaterial denkbar:

- -10 m/z ($-\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$)
- -20 m/z ($-2\text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)
- -28 m/z ($-\text{N}_2$)
- -38 m/z ($-2\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$)
- -56 m/z (-2N_2)

Betrachtet man die Ergebnisse nach der Bestrahlung (Abbildung 3.18), so fällt auf, dass neben drei Produkten mit erwarteten Massenunterschieden zum Edukt auch Produkte mit ungewöhnlichen Massendifferenzen detektiert wurden (Abbildung 3.18).

3 Ergebnisse

Trotzdem war die Detektion von nur fünf Verbindungen überraschend, besonders da von den erwarteten Massen nur zwei (-38 m/z , -10 m/z) im Spektrum gefunden wurden. Die Massendifferenz von -38 m/z wurde bei zwei Produkten (5.85 min u. 6.10 min) gefunden, die wie auch alle anderen schon nach 1 min Bestrahlung detektiert wurden. Neben diesen beiden Produkten ist nur noch das Produkt bei 7.07 min mit einer Massendifferenz von -10 m/z erklärbar. Zwei weitere Produkte weisen einen Massenshift von -37 m/z bzw. -47 m/z zum Edukt auf. Beide sind ohne Strukturaufklärung nicht erklärbar. Von den zu Beginn gefundenen fünf Photolyseprodukten, sind nach 2 min Bestrahlung nur noch die Peaks mit einer Massendifferenz -38 m/z vorhanden, wobei einer schon von so geringer Intensität ist, dass er kaum noch detektiert werden konnte.

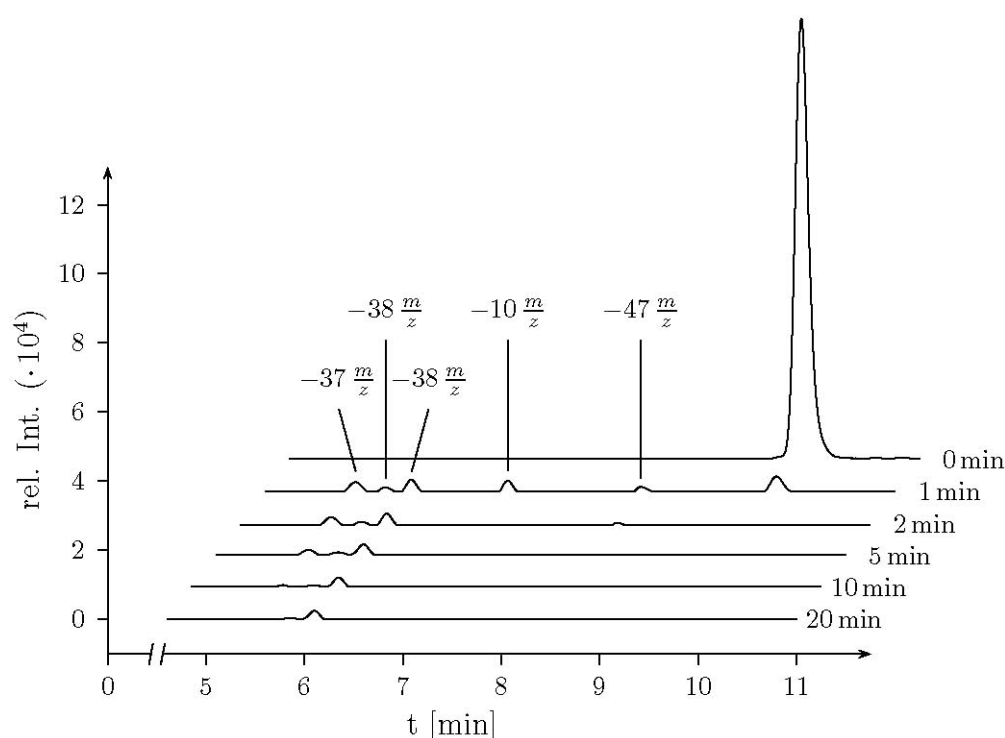


Abbildung 27: Abblitzstudie *m,m*-Bisazido-Scaffold

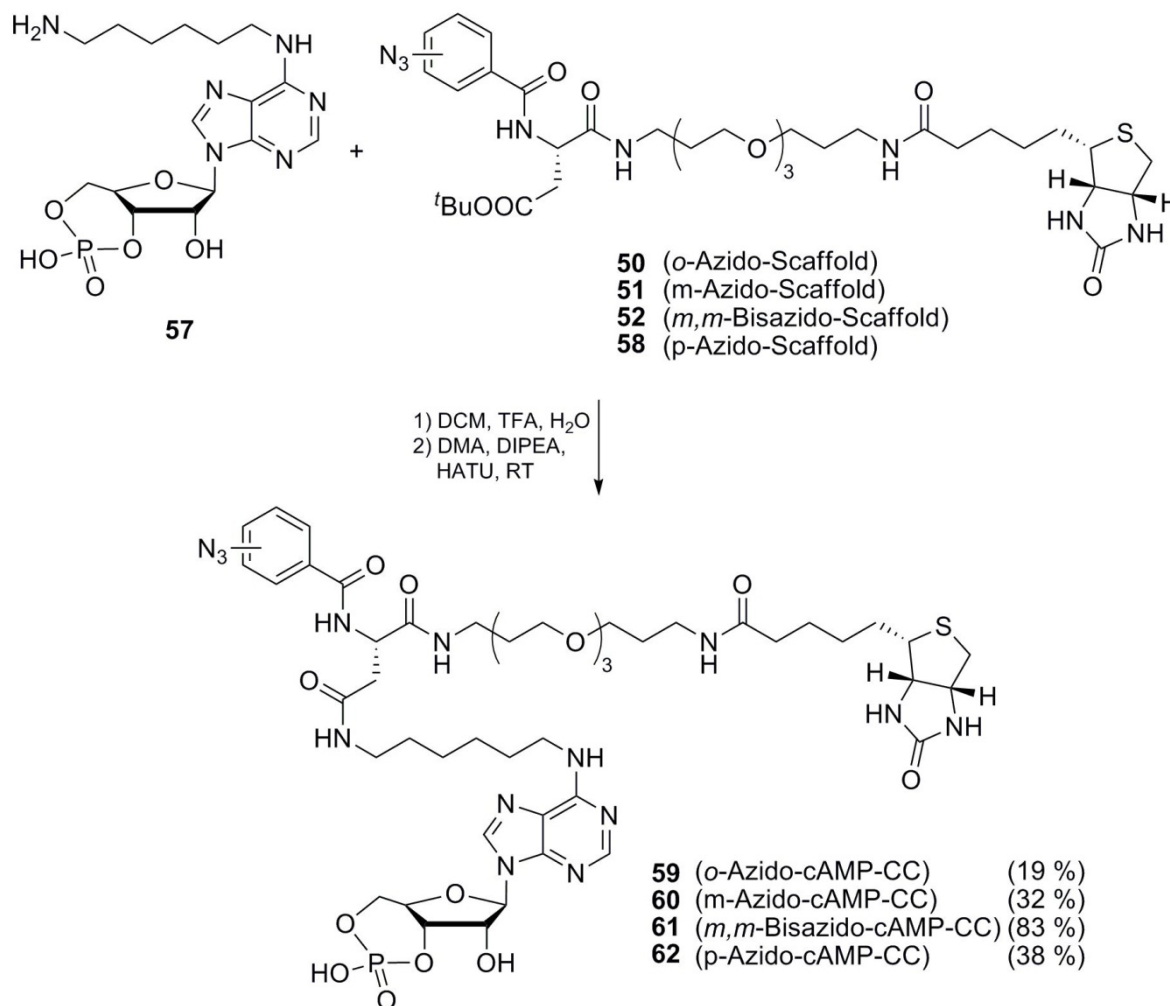
$T = 1 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, Bestrahlungsdauer: 0 – 20 min

$\lambda_{\text{max}} = 310\text{ nm}$, $V = 100\text{ }\mu\text{l}$

Neben den beschriebenen ungewöhnlichen Massendifferenzen zweier Photolyseprodukten, wurde auch hier, wie beim *o*-Azido-Scaffold (Abbildung 26), ein unvollständiger Abbau nach 1 min beobachtet. Zusammenfassend lassen sich sämtliche neuen Scaffolds unter den Bedingungen der caproBox innerhalb vergleichbarer Zeiten aktivieren und weisen überwiegend eine normale Photochemie auf. Somit sollte prinzipiell die Verwendung dieser Scaffolds in Capture Compounds möglich sein.

3.2.3 Synthese von cAMP-Capture Compounds

Für die Synthese von Modell-CCs wurde cAMP als Selektivitätsfunktion gewählt, da in der Abteilung Biochemie große Erfahrung mit cAMP-CCs besteht. Dadurch lassen sich mit den neuen CCs erhalten Ergebnisse leichter bewerten.



Schema 24: Synthese der cAMP-Capture Compounds

Die Synthese der vollständigen Capture Compounds aus den entsprechenden Scaffolds und kupplungsfähigem cAMP erfolgte zweistufig (Schema 24). Die erste Stufe, die saure Esterspaltung erfolgte quantitativ, was eine Aufreinigung der erhaltenen freien Säuren nicht notwendig machte. Die HATU vermittelte Kupplung erfolgte mit einem Überschuss an DIPEA, da von der Esterspaltung noch Reste an TFA vorhanden waren. Nach erfolgter Umsetzung erfolgte Reinigung mittels MPLC. Die geringen Ausbeuten von 19 – 38 % (12 – 28 mg) sind mit den Literaturangaben vergleichbar^[11]. Einzig die Synthese der *m,m*-Bisazido-cAMP-Capture Compound **61** gelang in 83 % Ausbeute.

3.2.4 Vergleichendes Capturen

Die zuvor synthetisierten Verbindungen wurden auf ihre Eigenschaften in Capture-Experimente hin untersucht. Dabei war von Interesse inwieweit die unterschiedlich positionierte Azid-Gruppe Einfluss auf die lichtinduzierte kovalente Verknüpfung von Capture Compound und Zielprotein besitzt. Dazu wurde im E.coli -Zelllysats unter Standardbedingungen „On-Bead-Experimente“ durchgeführt^[11]. Dabei wurden die Magnetbeads zuerst mit der Capture Compound inkubiert und anschließend in das Zelllysats gegeben. Zunächst wurden in einem Experiment die Capture Compounds **59** (*o*-N₃), **60** (*m*-N₃) und **62** (*p*-N₃) getestet. Nach erfolgter Isolierung und Waschen der Zielproteine erfolgte die anschließende Visualisierung mittels silber-gefärbtem SDS-PAGE Gelen (Abbildung 28).

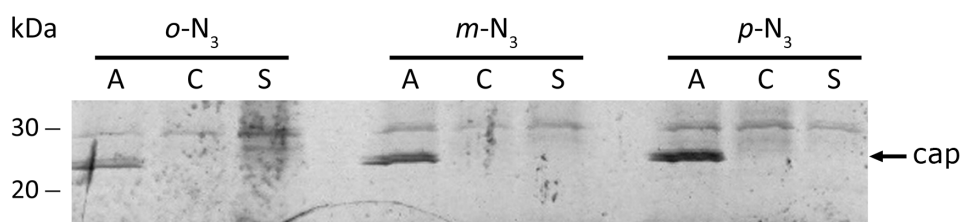


Abbildung 28: Capture-Ergebnisse mit *o*-, *m*- und *p*-Azido-cAMP-Capture Compounds

A: Ansatz, C: Kompetition, S: Scaffold

In allen drei Fällen konnte das Zielprotein (catabolite gene activator (cap), 24 kDa) spezifisch isoliert und identifiziert werden (Banden A). Die Banden C und S stellen die Kontroll-experimente da, in denen einerseits vor Zugabe der Capture Compound noch freies cAMP (Bande C) zugesetzt und andererseits das Experiment nur mit dem Scaffold (ohne Selektivitätsfunktion, Banden S) durchgeführt wurde. In jedem dieser Kontrollexperimente konnte das Zielprotein nicht im silber-gefärbten SDS-PAGE nachgewiesen werden, was für eine hohe Spezifität der eingesetzten Capture Compounds spricht. Nach den SDS-PAGE Ergebnissen scheint die *ortho*-positionierte Azidgruppe am schlechtesten und die *para*-Azidgruppe am besten zu einer erfolgreichen Isolierung des Zielproteins geeignet zu sein. Eine genauere Analyse erfolgte parallel mittels Nano-LC/MS-MS, nach weiteren Waschschritten und anschließender tryptische Fragmentierung. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeichnen ein etwas anderes Bild (Tabelle 3). Die in der Tabelle dargestellten Number of Peptides bezeichnet die Anzahl von Peptiden, die in mehreren Ladungszuständen eindeutig identifiziert wurden. In beiden Analysemethoden ist die Verbindung **59** (*o*-N₃) am schlechtesten für eine Proteinisolierung geeignet. Bei den Verbindungen **60** (*m*-N₃) und **62** (*p*-

3 Ergebnisse

N₃) widersprechen sich die Ergebnisse dahingehend, dass die nach SDS-PAGE-Analyse bessere Positionierung der Azidgruppe in *para*-Position laut MS-MS-Analyse schlechter als die CC **60** in der die Azidgruppe in der *meta*-Position ist.

Tabelle 3: Einfluss der Azidposition auf das Captureverhalten von cAMP-Verbindungen in *E.coli*

Protein	<i>o</i> -N ₃			<i>m</i> -N ₃			<i>p</i> -N ₃		
	A	C	S	A	C	S	A	C	S
cap	3	1	1	7	1	0	4	1	0

A: Ansatz, C: Konkurrenz, S: Scaffold, Auswahlkriterien: min. Protein: 95%, Number of Peptides: 1, min. Peptides: 90%, dargestellt: Number of Unique Peptides^[75, 76]

Unter gleichen Bedingungen war das erhaltene Capture-Ergebnis mit der *m,m*-Bisazido-cAMP-Capture Compound **61** schlechter als erwartet. Bereits im silber-gefärbtem SDS-PAGE Gel ist eine unvollständige Konkurrenz zu erkennen (Abbildung 29).

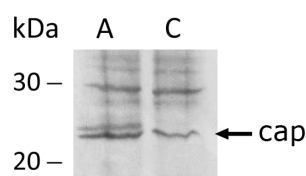


Abbildung 29: Capture-Ergebnis mit *m,m*-Bisazido-cAMP-Capture Compound

A: Ansatz, C: Konkurrenz

Dieses Ergebnis wurde von der massenspektrometrischen Analyse bestätigt (Tabelle 4). Das Zielprotein catabolite gene activator (cap) (24 kDa) wurde nicht vollständig kompetiert.

Tabelle 4: Capture-Ergebnisse mit *m,m*-Bisazido cAMP-Capture Compound

Protein	A	C
cap	9	4

A: Ansatz, C: Konkurrenz, Auswahlkriterien: min. Protein: 95%, Number of Peptides: 1, min. Peptides: 90%, dargestellt: Number of Unique Peptides^[75, 76]

Eine weitere Validierung der beschriebenen Ergebnisse erfolgt unter verschiedenen biochemischen Bedingungen in der Abteilung Biochemie im Rahmen einer Diplomarbeit.

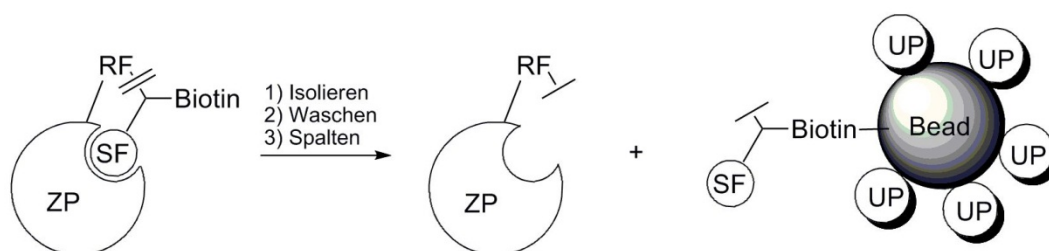
3.2.5 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel beschriebenen CCs sind unterschiedlich gut dazu geeignet, Zielproteine zu isolieren, wobei eine Positionierung der Azidgruppe in *ortho*-Position in allen Versuchen die ungünstigste Variante war. Die in der Abteilung Biochemie im Rahmen einer Diplomarbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Unterschiede zwischen **60** (*m*-N₃) und **62** (*p*-N₃) abhängig von den getesteten Zelllysaten und den Versuchsbedingungen sind. Die klare Aussage über die Abhängigkeit und wann welche CC genutzt werden sollte ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die Vermutung, dass es durch die Verwendung von zwei Azidgruppen zu einer besseren Crosslinkausbeute kommt, konnte noch nicht bestätigt bzw. widerlegt werden. Erste Ergebnisse lassen vermuten, dass eine zweite Azidgruppe in der Capture Compound das Capture Ergebnis nicht positiv beeinflusst und sich sogar eventuell stören auswirkt. Dahin zielende Versuche dauern in der Abteilung Biochemie noch an.

3.3 Spaltbare Reaktivitätsfunktion

3.2.1 Synthese eines Scaffolds & cAMP-Capture Compound

Im folgenden Abschnitt wird die Synthese von nasschemisch spaltbaren Reaktivitätsfunktionen, fertiger Scaffolds und daraus resultierenden Capture Compounds beschrieben. Die Verwendung von solchen spaltbaren Reaktivitätsfunktionen soll die Isolierung und insbesondere eine Freisetzung des isolierten, gewaschenen und möglichst noch nativen Proteins gestatten (Schema 25).



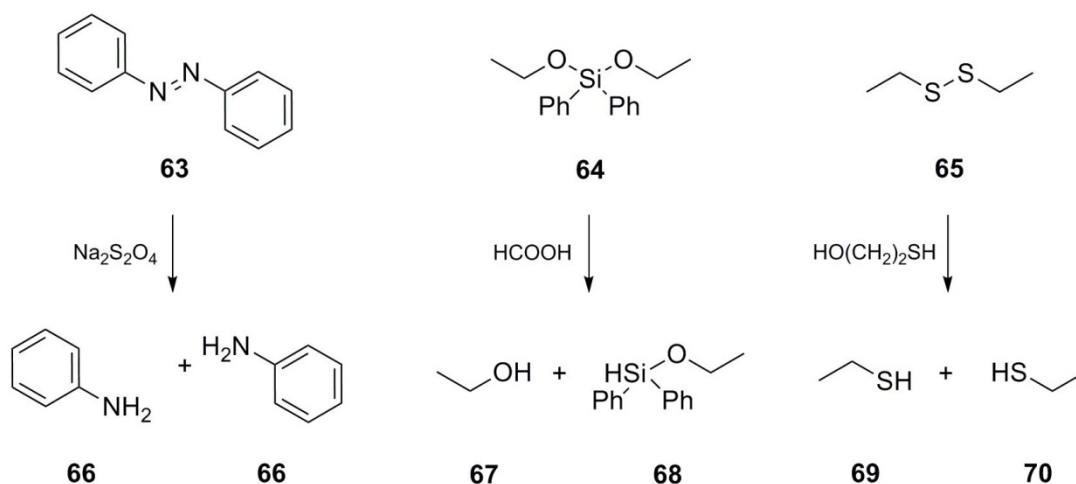
Schema 25: Mögliche Spaltung des Scaffolds nach erfolgreichem Capturing

Gelingt die Freisetzung des Proteins unter so schonenden Bedingungen, dass das Protein weiterhin nativ ist, wären anschließende Untersuchungen und Charakterisierung von bisher in ihrer Funktion unbekannten Zielproteinen möglich. Dazu muss eine spaltbare Reaktivitätsfunktion zwei wichtige Kriterien erfüllen. Zum einen muss das spaltbare Strukturelement unter den Belichtungsbedingungen der capro-Box stabil sein. Zum anderen muss die Spaltung unter so milden Bedingungen erfolgen, dass das isolierte Protein nicht geschädigt wird. Unter den verschiedenen spaltbaren Strukturelementen eignen sich im Wesentlichen drei Gruppen von Verbindungen:

- Azo-Verbindungen, z.B. **63**
- Dialkoxydiphenylsilane, z.B. **64**
- Disulfide, z.B. **65**

Für alle drei Gruppen (Azo-Verbindungen, Dialkoxydiphenylsilane u. Disulfide) ist unter jeweiligen milden Bedingungen auch in Anwesenheit eines Proteins die Spaltung schon gezeigt worden, (Schema 26)^[57] wobei sich besonders verschiedene Azo-Derivate bewährt haben^[6, 53, 54, 56]. Diese sind neben ihrer erfolgreichen Anwendung in biochemischem System auch dadurch gekennzeichnet, dass sie synthetisch über verschiedene Wege sehr leicht zugänglich sind. Ein weiterer potentieller Vorteil ist, dass solche Azosysteme einer photoinduzierten *E-Z*-Isomerisierung unterliegen^[77].

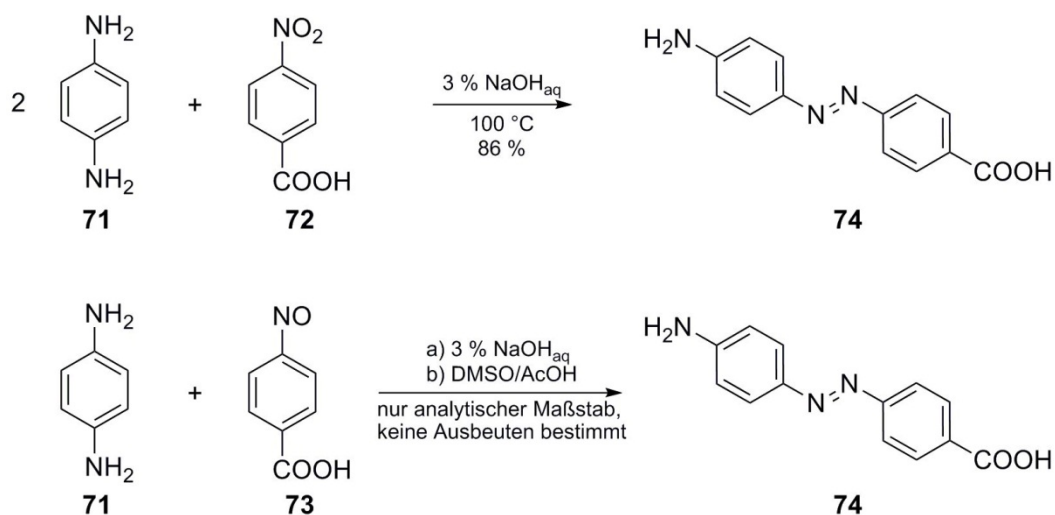
3 Ergebnisse



Schema 26: Nasschemisch spaltbare Gruppen & Spaltungsprodukte

Dadurch kann es zu einer günstigeren Positionierung des Azides und somit zu einem verbesserten Captureverhalten kommen. Ein sehr guter Zugang zu solchen Azoverbindungen wurde von Kessler *et al.*^[77] beschrieben, der einen sehr leichten Aufbau von Aminoazobenzoessäuren gestattet.

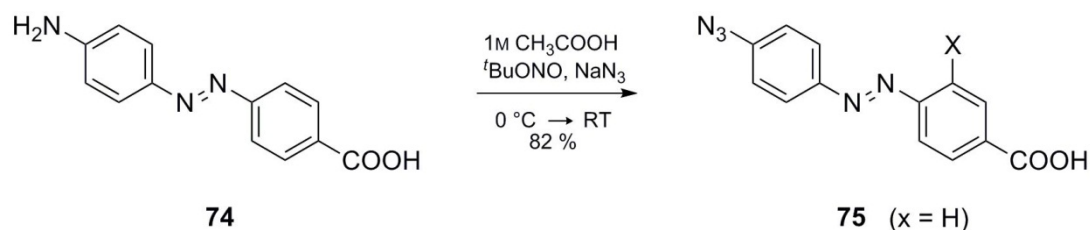
Dazu wurden die beiden käuflich erhältlichen Edukte 1,4-Diaminobenzol und *p*-Nitrobenzoesäure in 3%iger Natriumlauge über mehrere Stunden erhitzt. Dabei werden von der Aminokomponente 2Äquivalente benötigt, da sie einmal als Reduktionsmittel wie auch als Reaktionspartner dient. Durch das Ausfällen des Produktes mit Salzsäure konnte eine Steigerung der Ausbeute von 68%^[77] (ohne Zugabe von Salzsäure) auf 86% erreicht werden.



Schema 27: Synthese von Azo-Aminosäuren

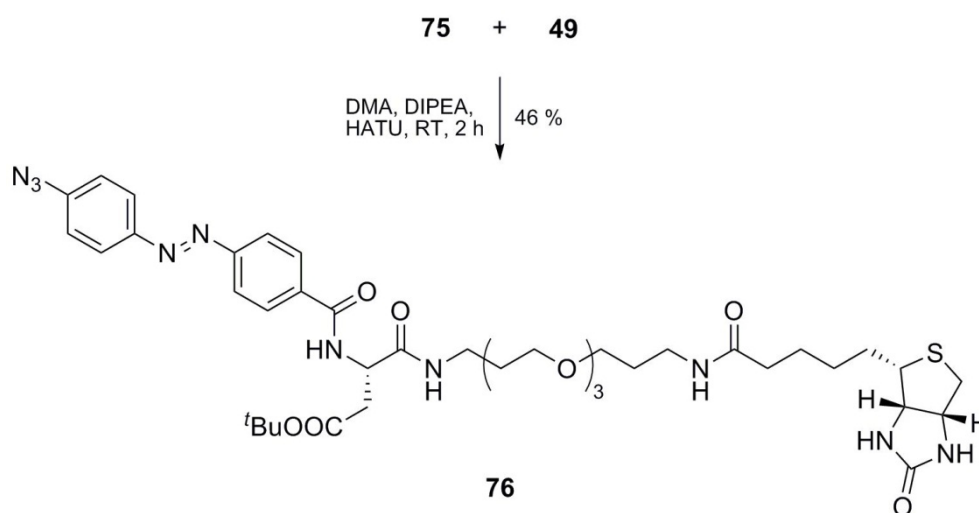
Wird jedoch anstelle des Nitroaromaten **72** der Nitrosoaromat **73** verwendet, dürfte nur ein Äquivalent Amin notwendig sein. Vorversuche im analytischen Maßstab haben gezeigt, dass die Umsetzung mit dem entsprechenden Nitrosoaromaten^[78] unter gleichen Bedingungen wie

mit dem Nitroaromaten ebenso zur Bildung der Azoverbindung führt. Die in der Literatur bevorzugte Variante dieser Reaktion wird in einem DMSO/AcOH Gemisch durchgeführt (Schema 27)^[79]. Obwohl ebenso gute Umsätze erhalten werden, ist die Verwendung eines basischen wässrigen Systems deutlich vorteilhafter, da es die Isolierung des Produktes durch Fällung durch HCl-Zugabe erleichtert. Die anschließende Darstellung der Azidoazobenzoessäure **75** erfolgte mit *tert*-Butylnitrit und Natriumazid (Schema 28) unter schon bekannten Bedingungen^[74] zu einer spaltbaren Reaktivitätsfunktion. Ähnliche Verbindungen wurden bereits von Blobel *et al.*^[55] zur Analyse von Proteinen mittels Autoradiographie verwendet (X = ¹²⁵I).



Schema 28: Synthese spaltbarer aromatischer Azoazide

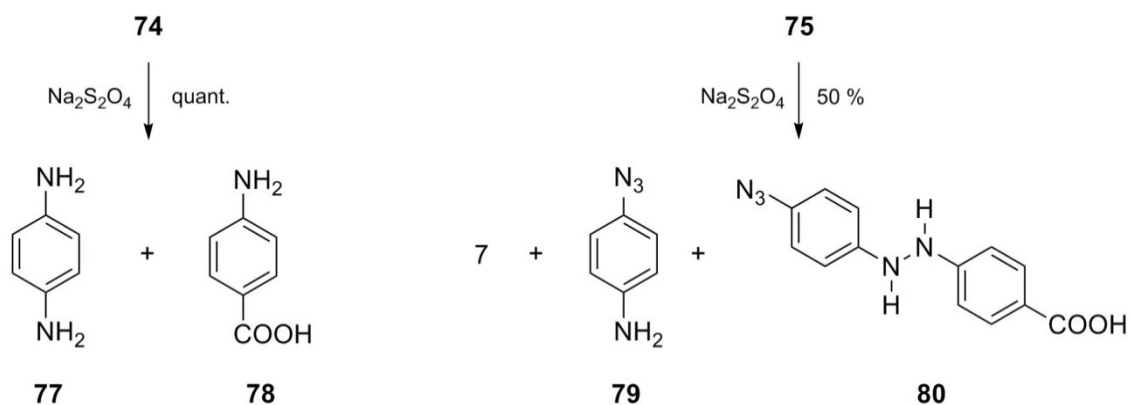
Eine Reinigung des durch Ausfällung erhaltenen Rohproduktes wurde nicht durchgeführt. Die erzielte Qualität war ausreichend, um die folgende Peptidkupplung mit dem Open Scaffold **49** erfolgreich durchzuführen.



Schema 29: Scaffoldsynthese mit einer spaltbaren Reaktivitätsfunktion

Andererseits war eine chromatographische Reinigung nicht ohne weiteres möglich, da das Produkt fast unlöslich in den gängigen, für die Chromatographie verwendeten Lösemitteln war. Versuche zu Umkristallisierungen und Umfällungen mittels pH-Wert Änderungen erbrachten keine guten Resultate. Die Umsetzung des Rohproduktes **75** mit dem Open

Scaffold **49** erfolgte mit HATU/DIPEA. Das Scaffold **76** wurde nach chromatographischer Reinigung in 46 % Ausbeute erhalten (Schema 29).



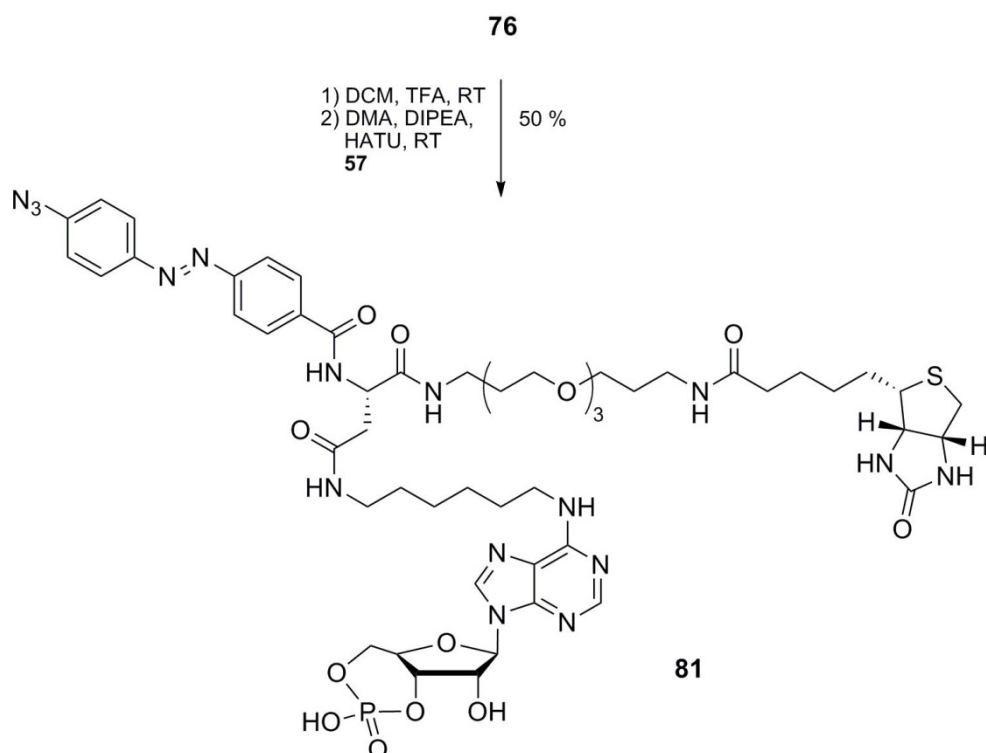
Schema 30: Spaltungsuntersuchungen mit Natriumdithionit

1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 1x PBS, c = 42 μM ,

Inkubationsdauer: 30 min, Raumtemperatur

Die Analyse der Lösungen erfolgte mittels HPLC-MS. So wurde die Aminosäure **74** unter den in Schema 30 gezeigten Bedingungen quantitativ gespalten, die Azidoazobenzoesäure **75** jedoch nur unzureichend und deutlich langsamer als die Aminosäure **74**. Der Umsatz an vollständiger Spaltung betrug ca. 75 %. Neben der erwarteten *p*-Aminobenzoessäure **78** wurden auch noch ca. 25 % des Zwischenproduktes **80** detektiert werden. Das ebenfalls erwartete *p*-Azidoanilin **79** wurde nicht detektiert. Des Weiteren wurde bei diesen Untersuchungen gefunden, dass die verwendete Natriumdithionitlösung immer frisch hergestellt werden muss. Trotz Entgasen war die Lösung nach einem Tag nicht mehr verwendbar. Die Notwendigkeit von frisch hergestellter Natriumdithionitlösung für eine erfolgreiche Spaltung von Azoverbindungen ist nicht in der Literatur beschrieben^[53]. Wurde das Experiment nach Bestrahlung der Azidoazobenzoesäure **75** wiederholt, gelang die vollständige Spaltung unter identischen Bedingungen ebenfalls quantitativ, die Voraussetzung für die Verwendung als spaltbare Reaktivitätsfunktion.

Für die Untersuchung, inwieweit sich derartige Azo-Reaktivitätsfunktionen für Capture Experimente eignen, wurde eine cAMP-Capture Compound als Referenzverbindung synthetisiert. Nach Spaltung des *tert*-Butylesters **76** erfolgte die Peptidkupplung mitverknüpfungsfähigem cAMP **57** unter Standardbedingungen (Schema 31). Die cAMP-Capture Compound **81** konnte mit für diese Reaktion sehr guten 50 % Ausbeute erhalten werden.



Schema 31: Synthese einer cAMP-CC mit einer spaltbaren Reaktivitätsfunktion

3.3.2 Capture Experiment mit einer Azo-cAMP-Capture Compound

Um in einer Machbarkeitsstudie zu prüfen, inwieweit sich die dargestellte spaltbare Reaktivitätsfunktion für ein erfolgreiches Photolabeling mit Capture Compounds eignet, wurde mit der cAMP-CC 81 im *E.coli*-Zelllysat unter Standardbedingungen ein On-Bead-Experiment^[11] durchgeführt.

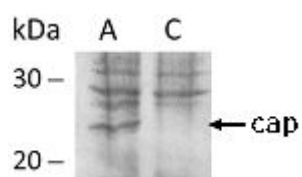


Abbildung 30: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound

A: Ansatz, C: Konkurrenz

In dem abgebildeten Ausschnitt des erhaltenen, silber-gefärbten Geles (Abbildung 30), ist das Zielprotein catabolite gene activator (cap) (24 kDa) mit sehr guter Konkurrenz zu erkennen. Die Auswertung der parallel durchgeführten massenspektroskopischen Analyse (Tabelle 5) bestätigt das Gelbild.

3 Ergebnisse

Tabelle 5: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound

Protein	<i>o</i> -N ₃	
	A	C
cap	9	4

A: Ansatz, C: Konkurrenz, Auswahlkriterien: min. Protein: 95%, Number of Peptides: 1, min. Peptides: 90%, dargestellt: Number of Unique Peptides^[75, 76]

Obwohl noch keine vergleichenden Aussagen über die Qualität dieser neuen Reaktivitätsfunktion getroffen werden können, ist gezeigt worden, dass ein prinzipieller Einsatz von Azoverbindungen als Reaktivitätsfunktion ohne weiteres möglich ist. Daraufhin durchgeführte Vorversuche mit Dithionit das spezifisch isolierte Zielprotein wieder freizusetzen schlugen fehl. Nach einem Standard-Capture Experiment wurde versucht, durch Inkubation mit Natriumdithionit (100 µl, 1 mM) das Zielprotein wieder durch Waschschrte zu entfernen. Das Experiment wurde mit aufgereinigter PKA-R1 (43 kDa) durchgeführt. Diese ließ sich jedoch nicht wieder freisetzen (Abbildung 31).

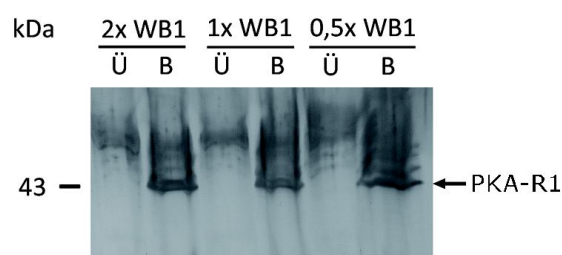


Abbildung 31: Capture-Ergebnisse mit Azido-Azo-cAMP-Capture Compound

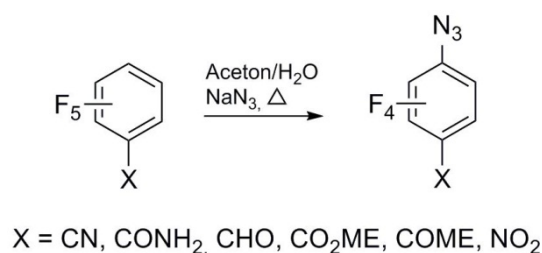
B: Beads, Ü: Überstand

Im silber-gefärbten SDS-PAGE konnte das Zielprotein nur an den Beads (Abbildung 31, B) nachgewiesen werden. Bei erfolgreicher Freisetzung der PKA-R1 sollte diese im Überstand nachweisbar sein. Ein möglicher Grund für die nicht erfolgte Freisetzung kann die zu hohe Bindungsaffinität (nM-Bereich) des cAMP sein.

Eine genaue Untersuchung der möglichen Abspaltung von Azo-Capture Compounds wird im Rahmen eines ZIM-Projektes mit ATP als Selektivitätsfunktion durchgeführt. Dafür wurde eine weitere spaltbare Reaktivitätsfunktion entwickelt (siehe Kapitel 3.3.3). Die daraus resultierenden Scaffolds wurden auf ihr photochemisches Verhalten und nach Spaltungsbedingungen hin untersucht und dem Projektteam zur Verfügung gestellt. Neben diesen ATP-CCs mit spaltbaren Reaktivitätsfunktionen sind für weitere spaltbare CCs Selektivitätsfunktionen zu bevorzugen, die nur im µ – mM-Bereich (z.B. Kohlenhydrate) das Zielprotein binden, was die Abspaltung dieser CCs vom Zielprotein erleichtern sollte.

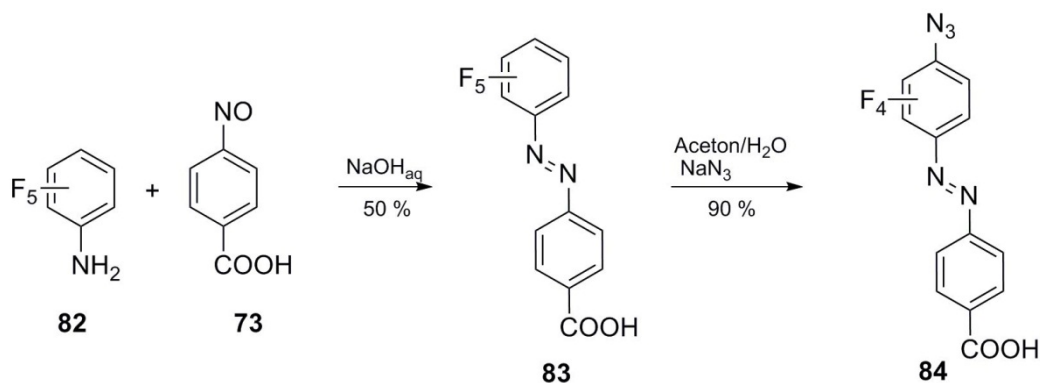
3.3.3 Entwicklung einer neuen spaltbaren Reaktivitätsfunktion

In Anlehnung an die guten Ergebnisse mit perfluorierten aromatischen Aziden als Reaktivitätsfunktion, im Vergleich zum nicht fluorierten Azid wurde auch nach einer Möglichkeit der Synthese einer spaltbaren, perfluorierten Reaktivitätsfunktion gesucht. Die Synthese von verschiedenen aromatischen perfluorierten Aziden verläuft über eine nucleophile aromatische Substitution, die einen *para*-positionierten elektronenziehenden Substituenten erfordert (Schema 32)^[21].



Schema 32: Synthese von perfluorierten aromatischen Aziden

Durch eine vorangegangene Umsetzung von Pentafluoranilin **82** mit der schon erwähnten Nitrosobenzoesäure **73** wird durch die Azobindung und die dazu *para*-ständige Carbonsäure eine Art „homologer“ elektronenziehender Substituent geschaffen (Schema 33).

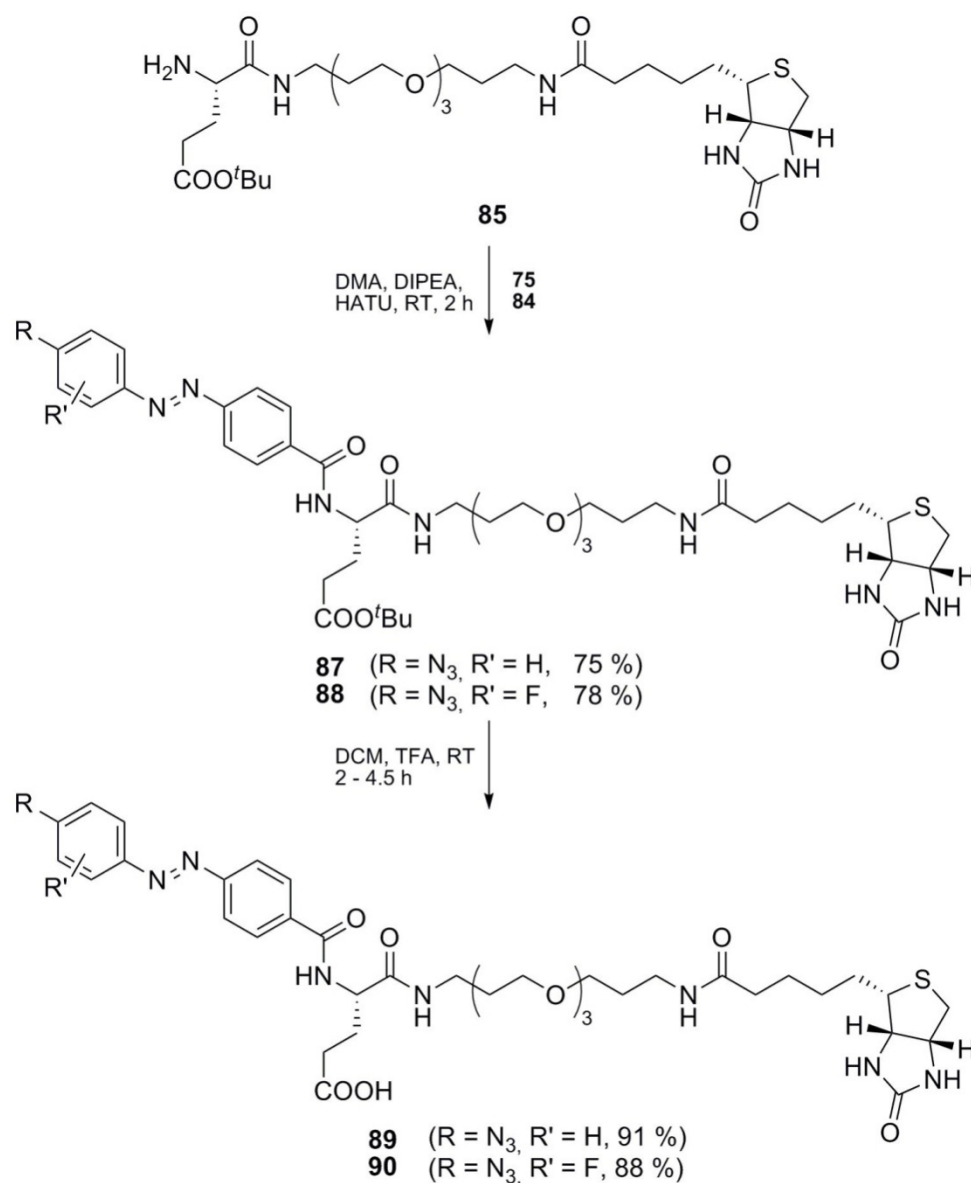


Schema 33: Darstellung der Terafluorazido-Azobenzoessäure

Unter den schon beschriebenen Bedingungen für eine Umsetzung von Anilinen mit Nitrosoaromaten gelang auch diese Umsetzung, bei der das Produkt nur mit Wasser gewaschen werden musste. Die erhaltene Azoverbindung **83** wurde in 50 % Ausbeute erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte in der Folgereaktion eingesetzt. Diese nucleophile aromatische Substitution gelang mit 90 % an isolierter Ausbeute. Das Produkt **84** wurde ebenfalls durch Zentrifugation abgetrennt und mehrmals mit HCl-saurem Wasser gewaschen.

3 Ergebnisse

Somit konnte eine bisher unbekannte, spaltbare fluorierte Reaktivitätsfunktion mit einer Gesamtausbeute von 45 % dargestellt werden.



Schema 34: Synthese von Scaffolds mit spaltbaren Reaktivitätsfunktionen

Für die Darstellung der für das ZIM-Projekt notwendigen Scaffolds wurden die beiden spaltbaren aromatischen Azide mit einem neuem Open Scaffold **85** umgesetzt. Dies wurde mit einem Glutamat-Kern anstelle des Asparagat-Kerns synthetisiert. Die um einen Kohlenstoff längere Kette vermindert die intramolekulare Cyclisierungsreaktion (Schema 14). Ansonsten beinhaltet dieses neue Open Scaffold **85** die gleichen Strukturmerkmale wie das vorherige auf. Mittels der HATU induzierten Peptidkupplung erfolgte die Synthese der Scaffolds **87** u. **88** in guten bis sehr guten Ausbeuten (Schema 34).

Nach durchgeführter saurer Spaltung des *tert*-Butylesters, wurden die Scaffolds **89** und **90** in 91 % bzw. 88 % Ausbeute nach Chromatographie erhalten (Schema 34). Diese wurden dem Projektteam für die Darstellung von ATP-Capture-Compounds zur Verfügung gestellt.

3.3.4 UV-Verhalten spaltbarer Reaktivitätsfunktionen

Da die eigentliche Reaktivitätsfunktion ein aromatisches Azid ist, wurde davon ausgegangen, dass die dargestellten Scaffolds sich in ähnlicher Weise wie die bereits untersuchten aromatischen Azide mit UV-Licht aktivieren lassen. Um den Einfluss der Azogruppe genau zu erfassen, wurde von den Scaffolds **89** und **90** Abblitzstudien durchgeführt.

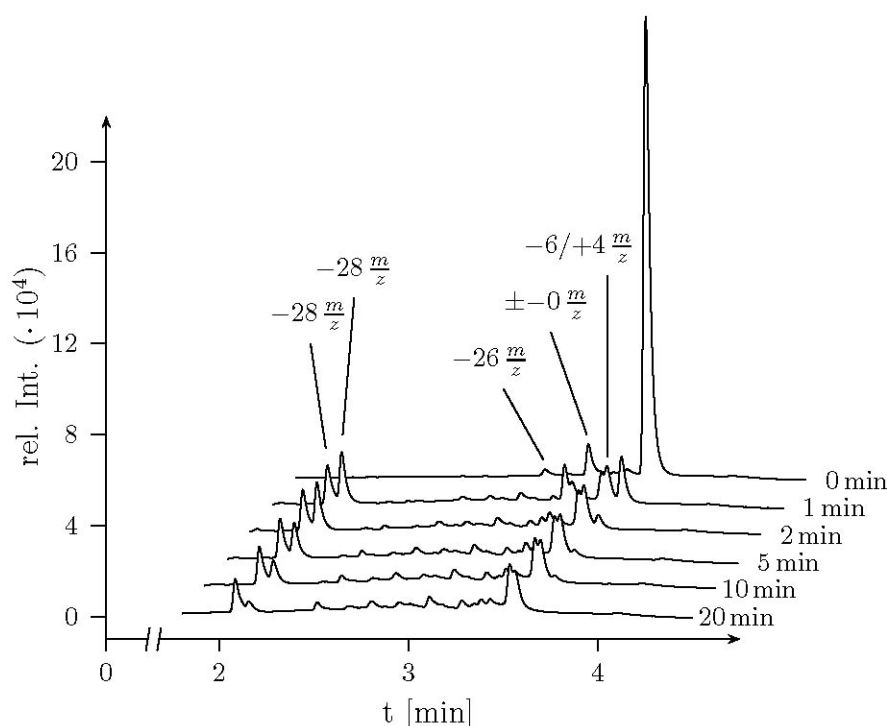


Abbildung 32: Abblitzstudie Azido-Azo-Scaffold

$c=50 \mu\text{M}$, $T=1-4 \text{ }^\circ\text{C}$, Bestrahlungsdauer:

0 – 20 min, $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $V = 100 \mu\text{l}$

Im Gegensatz zu den bisherigen aromatischen Aziden fällt auf, dass durch die Bestrahlung von **90** nach einer Minute eine Vielzahl von Abblitzprodukten gebildet wurde, deren Zuordnung nur teilweise möglich war. Erste Zerfallsprodukte konnten schon vor der Bestrahlung detektiert werden. Dabei handelt es sich bei einem jedoch um ein nicht photochemisch gebildetes Nebenprodukt. Dieses wies dieselbe Masse wie das Scaffold selbst auf und zerfiel ebenfalls unter Lichteinfluss. Das zweite, bereits seit Beginn vorhandene Nebenprodukt wies eine Massendifferenz von -26 m/z zum Edukt auf, was auf eine Reduktion der Azobindung ($+2 \text{ m/z}$) und Abspaltung von Stickstoff (-28 m/z) hindeutet. Von

3 Ergebnisse

den weiteren Hauptphotolyseprodukten zeigen nur zwei den charakteristischen Massenshift von (-28 m/z) (2.08 min und 2.15 min) zum Ausgangsmaterial, von denen eins (2.15 min) während der Bestrahlungsdauer von 20 min fast vollständig wieder abgebaut wurde. Nicht ohne Strukturaufklärung erklärbar sind die beiden Photolyseprodukte mit einem Massenshift von -6 bzw. $+4 \text{ m/z}$, die nicht vollständig aufgetrennt werden konnten und einen Doppelpeak im UV-Chromatogramm bei ca. 3.60 min bildeten.

Bei der Bestrahlung des Tetrafluor-Scaffoldes **90** bildeten sich vier Hauptphotolyseprodukte. Von diesen lagerte sich das primär entstandene Hauptprodukt bei 2.84 min mit einem Massenshift zum Edukt von -28 m/z innerhalb von 20 min fast vollständig zugunsten der anderen Photolyseprodukte um.

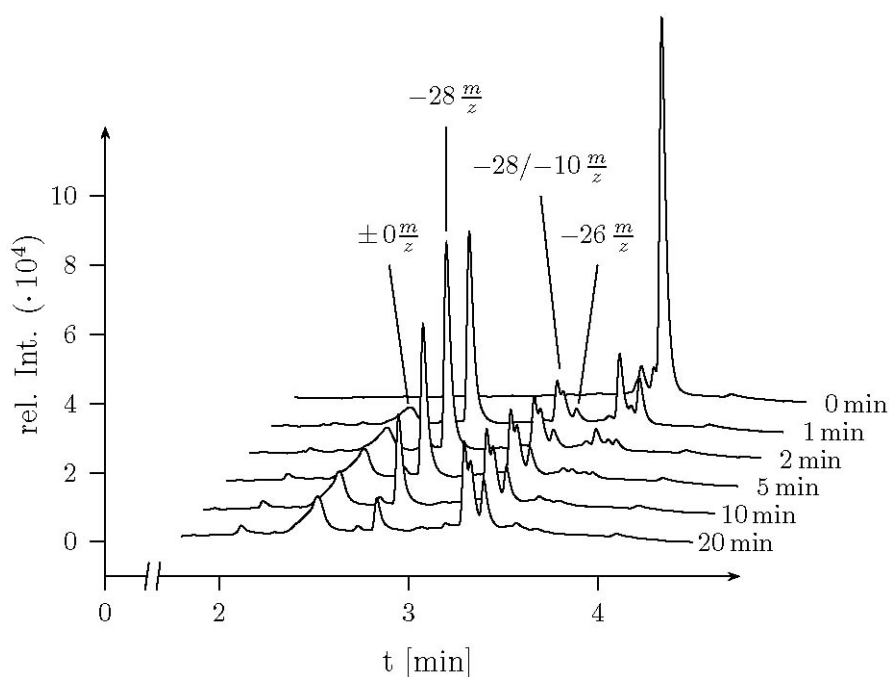


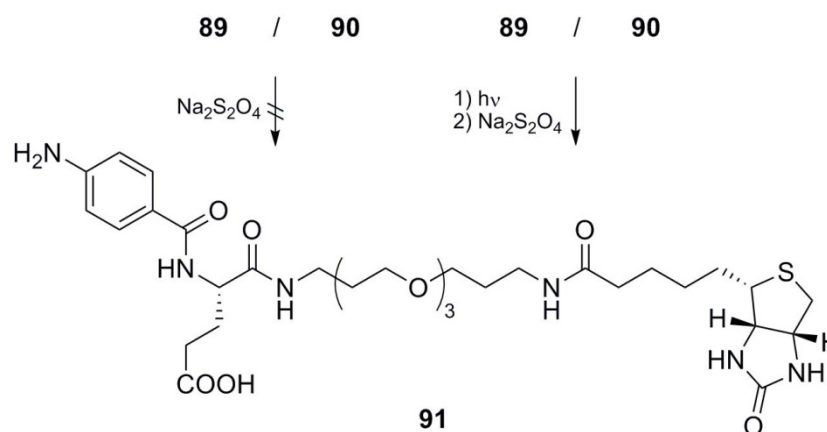
Abbildung 33: Abblitzstudie Tetrafluorazido-Azo-Scaffold

$c = 50 \text{ } \mu\text{M}$, $T = 1 - 4 \text{ } ^\circ\text{C}$,

Bestrahlungsdauer: 0 – 20 min, $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $V = 100 \text{ } \mu\text{l}$

Neben den Produkten mit einer Massendifferenz von -28 bzw. -10 m/z , die nicht vollständig aufgetrennt werden konnten und einen Doppelpeak bei 3.33 min bildeten, wurden ebenfalls zwei „untypische“ Photolyseprodukte mit einer Massendifferenz von -26 m/z bzw. $\pm 0 \text{ m/z}$ detektiert. Davon ist das zum geringen Teil gebildete Photolyseprodukt mit einer Massendifferenz von -26 m/z bei 3.41 min mit der Reduktion der Azogruppe vor oder nach Stickstoffabspaltung erklärbar. Wie es aber zu der Bildung eines Photolyseproduktes (2.52 min) mit identischer Masse kommen konnte, ist nicht erklärbar. Trotz ungewöhnlichen photochemischen Verhaltens gelang die Anregung der spaltbaren Reaktivitätsfunktionen innerhalb von 5 – 10 min unter Standardbedingungen. Wie bereits aus den in Schema 30

dargestellten Ergebnissen bekannt ist, differieren die Azoverbindungen in ihrer Aktivität gegenüber Natriumdithionit. Der wesentliche Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen elektronischen Einflüssen des Substituenten am Aromaten. Um den Einfluss der Fluoratome der neuen spaltbaren Reaktivitätsfunktion zu untersuchen, wurden vergleichende Experimente mit den Scaffolds **89** und **90** durchgeführt. Das zu erwartende Hauptprodukt **91** der reduktiven Spaltung muss bei beiden Edukten dasselbe sein (Schema 35).



Schema 35: Spaltung der Azo-Scaffolds **89** und **90**

Bestrahlungsdauer: 20 min, $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $V = 100 \text{ }\mu\text{l}$,

$T = 1 - 4 \text{ }^\circ\text{C}$, $c = 50 \text{ }\mu\text{M}$,

Natriumdithionitkonzentration: $500 \text{ }\mu\text{M}$

Inkubationszeit mit Natriumdithionit: 30 min

Nach Inkubation der Scaffolds **89** und **90** mit Natriumdithionit ($500 \text{ }\mu\text{M}$) gelang die reduktive Spaltung der Azobindung, ähnlich den in Schema 30 vorgestellten Ergebnissen, nicht. Wurden die Proben jedoch zuerst in der caproBox bestrahlt, war eine rasche reduktive Spaltung zu beobachten. In beiden Fällen konnte das Spaltungsprodukt **91** mittels HPLC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 34). Obwohl in beiden Fällen Nebenprodukte detektiert wurden, unterscheidet sich das Verhältnis des gewünschten Produktes zu nicht definierbaren Nebenprodukten deutlich. Die Spaltung des Tetrafluor-Azido-Scaffolds **90** verlief schlechter und lieferte einen deutlich geringeren Anteil des gewünschten Produktes (Abbildung 34). Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass nach lichtinduzierter Aktivierung der Azoazide, diese sich reduktiv spalten lassen. Die dafür benötigte Konzentration von $0.5 - 1 \text{ mM}$ war deutlich geringer als bei ähnlichen literaturbekannten Systemen^[56]. Dies ermöglicht die Anwendung der Dithionitspaltung in Gegenwart der verwendeten Magnetbeads, da diese sich bei einer Konzentration von $\geq 10 \text{ mM}$ derartig verändern, dass eine wirksame Isolierung der Zielproteine mit einem caproMag nicht mehr möglich ist. Die Empfindlichkeit der Beads

gegenüber Natriumdithionit ist dem Hersteller (Invitrogen) bekannt und wurde daraufhin nicht genauer untersucht.

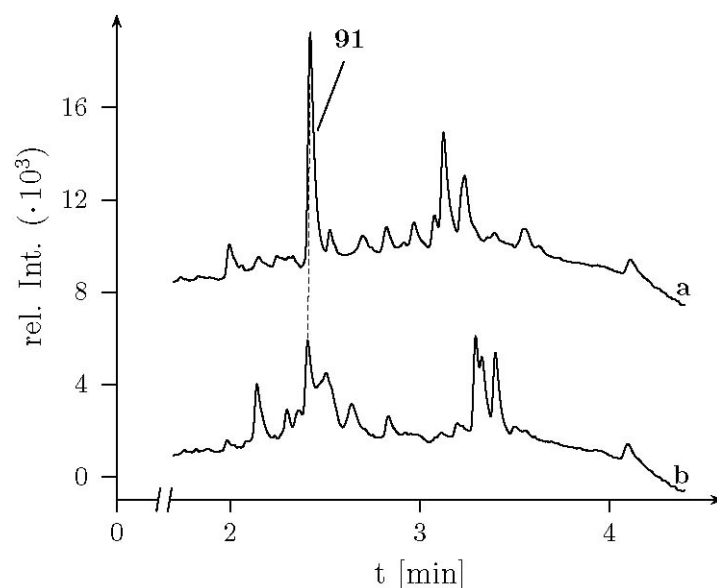


Abbildung 34: Nachweis des Spaltungsproduktes **91**

a Spaltungsprodukt im UV-Chromatogramm (254 nm) des HPLC-MS-Laufes von **89**, rel. Int. + 7000, b Spaltungsprodukt im UV-Chromatogramm (254 nm) des HPLC-MS-Laufes von **90**

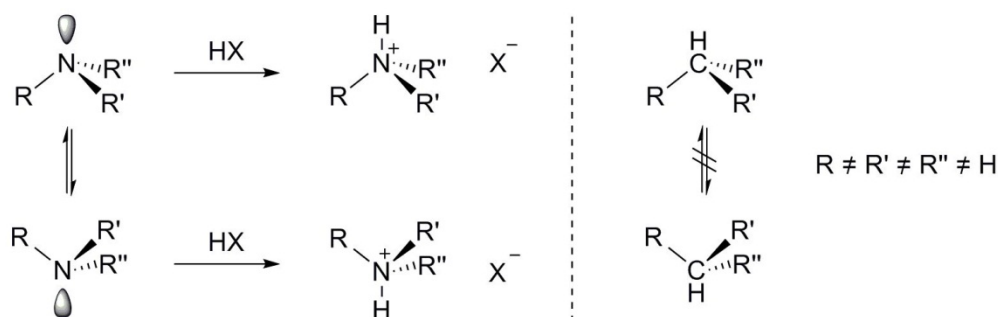
Basierend auf den in Abbildung 3.25 vorgestellten Ergebnissen empfiehlt sich jedoch die Verwendung der nicht fluorierten spaltbaren Reaktivitätsfunktion.

3.3.5 Zusammenfassung

Es wurde erfolgreich die Verwendung von aromatischen Azoaziden als Reaktivitätsfunktion in Capture Experimenten gezeigt. Die reduktive Spaltung mit Natriumdithionit dieser Azoazidfunktion gelang nur nach Bestrahlung mit UV-Licht und mit frisch hergestellter Natriumdithionitlösung. Zusätzlich erfolgte die Synthese einer neuen, perfluorierten und ebenfalls spaltbaren Reaktivitätsfunktion in nur zwei Stufen. Bei vergleichenden Spaltungsexperimenten der mit den Azoaziden synthetisierten Scaffolds zeigte sich, dass sich die perfluorierte aromatische Azoazidfunktion schlechter für die reduktive Spaltung eignet. Für eine erfolgreiche Ablösung der Capture Compound vom Protein muss eine Selektivitätsfunktion gewählt werden, die ihre Zielproteine im μ – mM-Bereich (z.B. Kohlenhydrate) binden.

3.4 Stickstoff als zentrales Verzweigungselement in Scaffolds

Im folgenden Abschnitt wird die Synthese von drei verschiedenen Scaffolds beschrieben, die auf Stickstoff als zentrales Verzweigungsatom beruhen. Durch den Verzicht auf ein Stereozentrum besitzen die aus diesen Scaffolds dargestellten Capture Compounds mehr Freiheitsgrade (Schema 36) und können sich dadurch besser an eine Proteinoberfläche anpassen.



Schema 36: Stickstoff vs. Kohlenstoff als zentraler Baustein im Scaffold

Da Amine sehr leicht protonierbar sind, würde durch die Salzbildung (Schema 36) eine erhöhte Wasserlöslichkeit des Scaffolds erreicht werden. Neben diesen Vorteilen der Amin-Scaffolds (kein Stereozentrum, bessere Wasserlöslichkeit), lassen sich Stickstoffatome leichter als Kohlenstoffatome funktionalisieren, was eine erleichterte Variation des Scaffolds während der Synthese erlaubt.

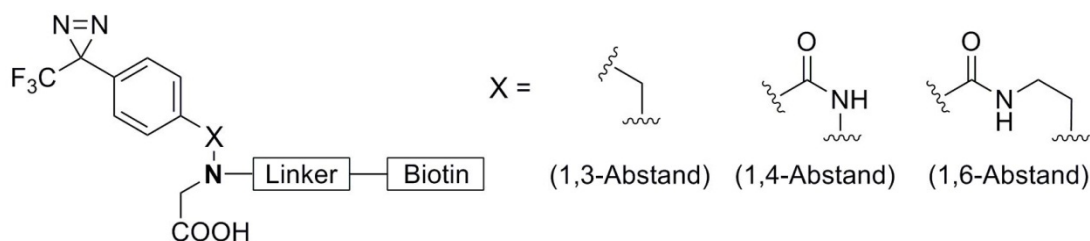
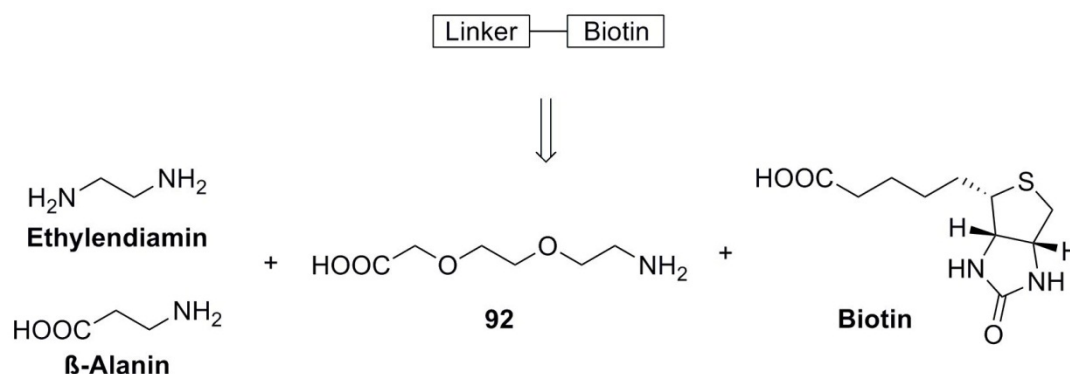


Abbildung 35: Unterschiedliche Abstände in Amin-Scaffolds

Um, neben dem Einfluss des zentralen Stickstoffes, auch den Einfluss des Abstandes von Reaktivitätsfunktion und Verzweigungspunkt auf das Capture-Verhalten zu untersuchen, wurden die Scaffolds mit unterschiedlichen Abständen (Abbildung 35) dargestellt. Nach der Synthese erfolgten photochemische Stabilitätsuntersuchungen und die anschließende Darstellung von cAMP-Capture Compounds.

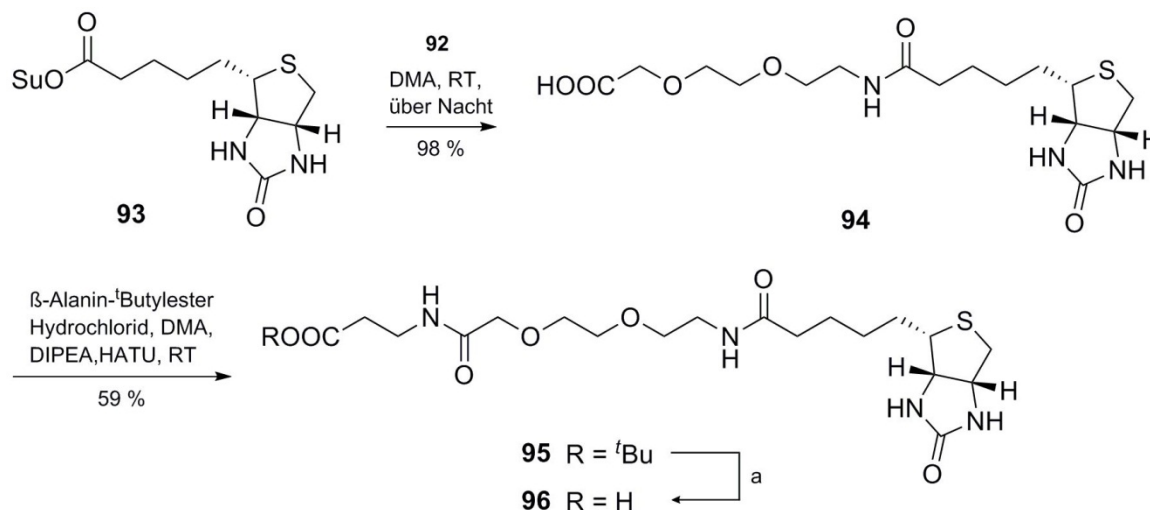
3.4.1 Darstellung von verschiedenen Biotin-Linkern

Die geplanten Scaffolds beinhalten eine unterschiedliche Kernstruktur bei annähernd gleichem Abstand zum Biotin (Abbildung 35). Um die Synthesen zu vereinfachen, sollten durch eine Variation von Ethylendiamin und β -Alanin verschiedene biotintragende Linker separat synthetisiert werden (Schema 37). Diese enden auf eine Carbonsäure (durch β -Alanin) bzw. auf ein Amin (durch Ethylendiamin) und sind dadurch für verschiedenste Kernstrukturen einsetzbar.



Schema 37: Retrosynthetische Analyse der Biotin-Linker

Dazu wurde entsprechend Schema 38 der Biotin-NHS-Ester **93** mit einem kurzen PEG-Linker **92** umgesetzt.



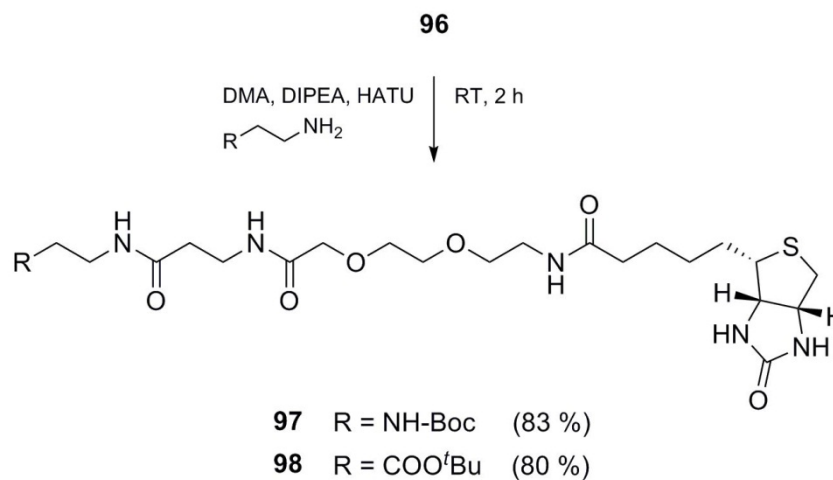
Schema 38: Umsetzung von Biotin-NHS mit PEG-Linker, β -Alanin-*tert*-Butylester Hydrochlorid

a: DCM, TFA, RT, quant

Anschließend erfolgte die HATU vermittelte Kupplung des erhaltenen Biotinlinkers **94** mit β -Alanin-*tert*-Butylester und Freisetzung der Carbonsäure **96** unter Standardbedingungen (Schema 38). Der Biotin-Linker **96** eignete sich sehr gut für die folgende Synthese von zwei

3 Ergebnisse

weiteren Biotin-Linkern, die je nach verwendetem Reaktionspartner (β-Alanin-*tert*-Butylester bzw. Boc-ethylendiamin) auf ein Amin bzw. einer Carbonsäure enden (Schema 39).

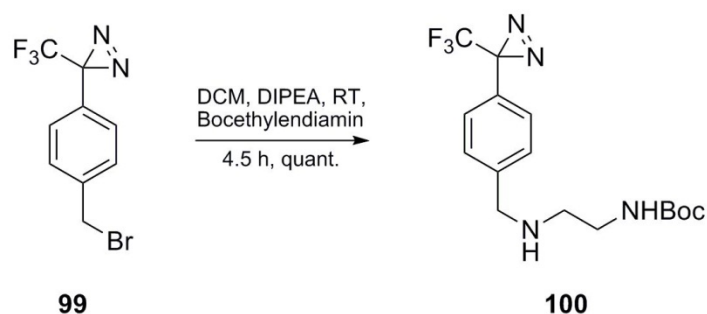


Schema 39: Umsetzung mit Boc-geschütztem Ethylendiamin bzw. β-Alanin-*tert*-Butylester Hydrochlorid

Die HATU vermittelten Amidkupplungen wurden mit HATU/DIPEA durchgeführt und lieferten nach Aufreinigung gute Ausbeuten von 83 % (**97**) bzw. 80 % (**98**).

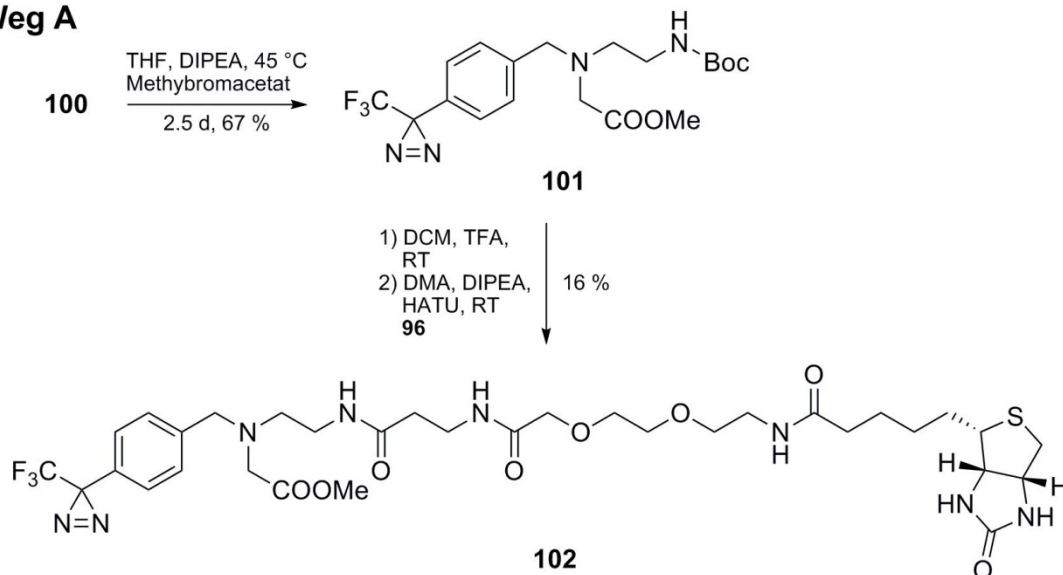
3.4.2 Darstellung eines Amin-Scaffolds mit 1,3-Abstand

Bei der Synthese des Scaffolds mit einem sehr kurzem Abstand zwischen der Reaktivitätsfunktion und dem Verzweigungspunkt wurde von dem literaturbekannten Benzylbromid **99**^[80, 81] ausgegangen, das aus der Benzoesäure **105** (siehe Schema 44) in zwei Stufen synthetisiert wurde.



Schema 40: Synthese des zentralen Strukturelements in Scaffold mit 1,3-Abstand

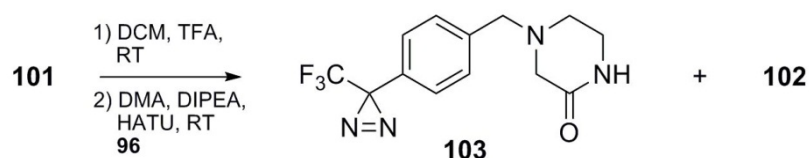
Von der Benzoesäure ausgehen, wurde das Bromid **99** über eine Reduktion der Carbonsäure zum Alkohol^[80] und anschließender Appel-Reaktion^[81, 82] erhalten. Im Folgeschritt erfolgte die quantitative Umsetzung zum Amin **100** (Schema 40).

Weg A

Schema 41: Synthese des Scaffolds mit 1,3-Abstand - Weg A

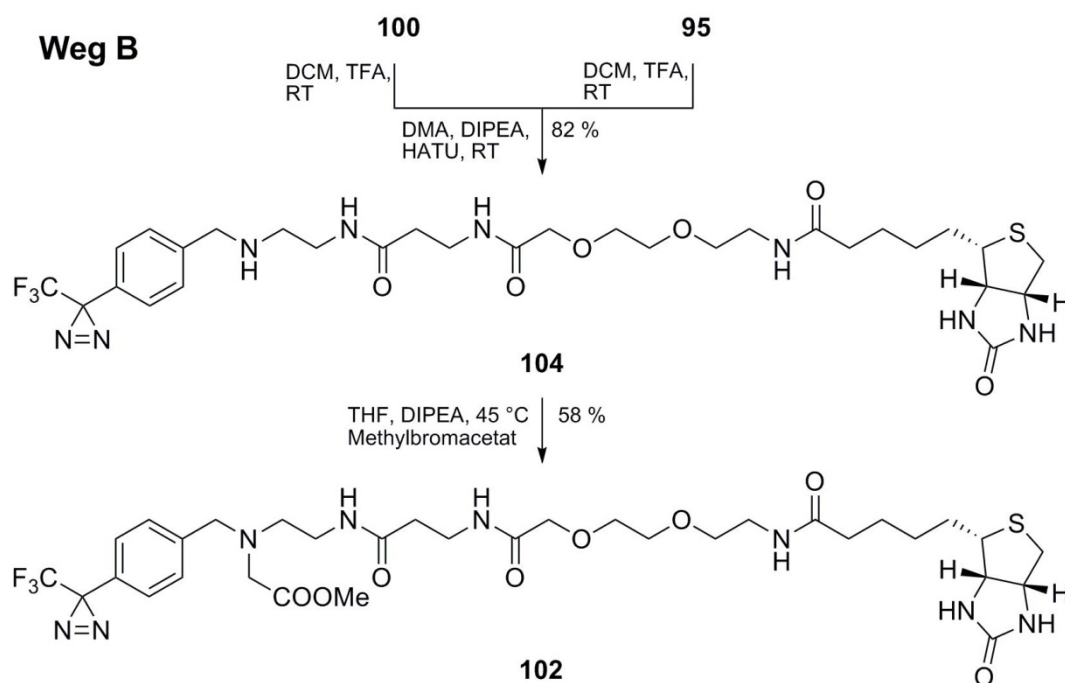
Anschließend wurden zwei mögliche Wege der Darstellung des fertigen, als Ester geschützten Scaffolds untersucht. Dabei war von besonderem Interesse zu welchem Zeitpunkt der Synthese die Verzweigung zur späteren Selektivitätsfunktion am effektivsten eingefügt werden konnte. Über Weg A wurde die Verzweigung als Methylacetatkette zu Beginn über

eine Alkylierung des Amins **100** mit Methylbromacetat zum tertiären Amin **101** eingefügt (Schema 41). Dieser zentrale Baustein des Scaffolds wurde anschließend nach Abspaltung des freien Amins mit dem vorher dargestellten Biotin-Linker **96** zum Scaffold-Methylester **102** in 16 % Ausbeute umgesetzt (Schema 41). Ein möglicher Grund für die sehr geringen 16 % im Weg A für **102** war die beobachtete Cyclisierungsreaktion zu **103**, die als Nebenreaktion zur Amidbildung standfand (Schema 42).



Schema 42: Nebenreaktion zum postulierten Cyclisierungsprodukt

Nach erfolgter Abspaltung der Boc-Schutzgruppe reichte die Reaktivität des Methylesters aus, um im basischen Milieu mit dem nun freien Amin zum Lactam **103** zu reagieren. Eine Isolierung dieses Nebenproduktes fand nicht statt. Die gezeigte postulierte Struktur basiert nur auf den erhaltenen MS-Daten und wurde nicht NMR-spektroskopisch bestätigt.



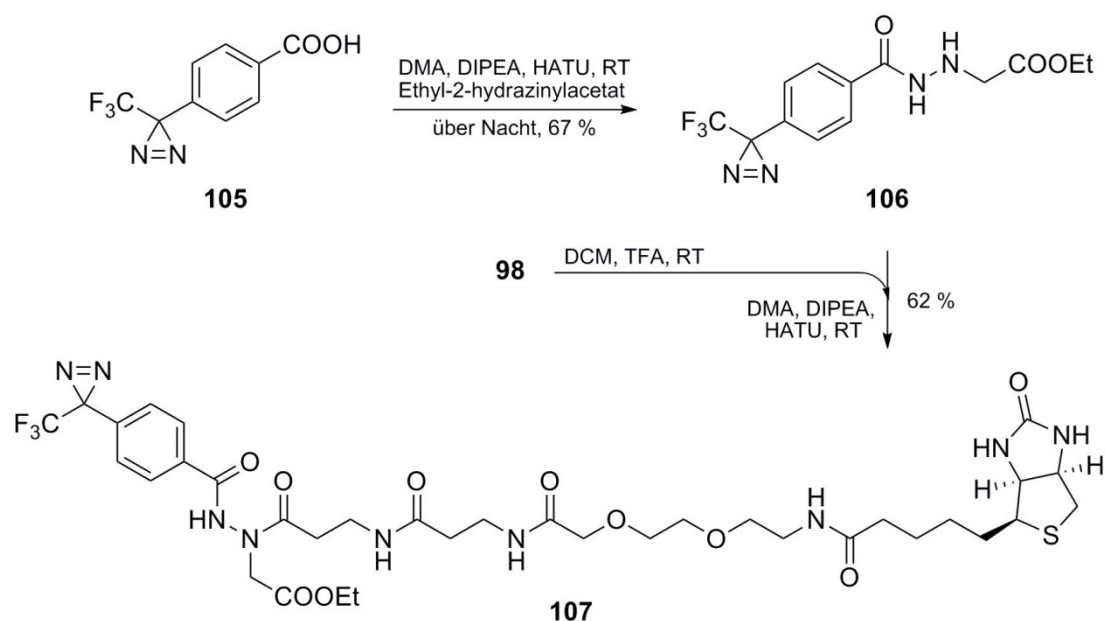
Schema 43: Synthese des Scaffolds mit 1,3-Abstand - Weg B

Im Weg B kam es zu einer Variation der einzelnen Reaktionsschritte, infolgedessen die Alkylierung zum Scaffold-Methylester **102** erst im letzten Schritt erfolgte. Dazu wurde vorher das Amin **100** erneut mit dem Biotin-Linker **96** umgesetzt, der jedoch durch Spaltung des *tert*-Butylesters in **95** neu dargestellt wurde. Die anschließende Alkylierung der Scaffoldvorstufe **104** zum Scaffold-Methylester **102** verlief unter den in Schema 43 gezeigten

Bedingungen ebenfalls mit Methylbromacetat. Dadurch, dass die Carboxymethylgruppe erst im letzten Schritt eingefügt wurde, war eine wie in Schema 42 gezeigte Cyclisierungsreaktion nicht möglich. Diese beiden untersuchten Wege unterscheiden sich nur in der Reihenfolge der wesentlichen Stufen (Alkylierung und Peptidkupplung). Durch die Vertauschung dieser beiden Stufen konnte die Gesamtausbeute an **102**, ausgehend von Amin **100** von 10.7 % (Weg A) auf 45.9 % (Weg B) gesteigert werden.

3.4.3 Darstellung eines Amin-Scaffolds mit 1,4-Abstand

Bei der Synthese eines Amin-Scaffolds mit einem 1,4-Abstand zwischen der Reaktivitätsfunktion und dem Verzweigungsatom, was dem Stickstoffanalogon des herkömmlichen Scaffolds entspricht, wurde von den kommerziell erhältlichen Verbindungen Diazirinbenzoesäure **105** und Ethyl-2-hydrazinylacetat ausgegangen.

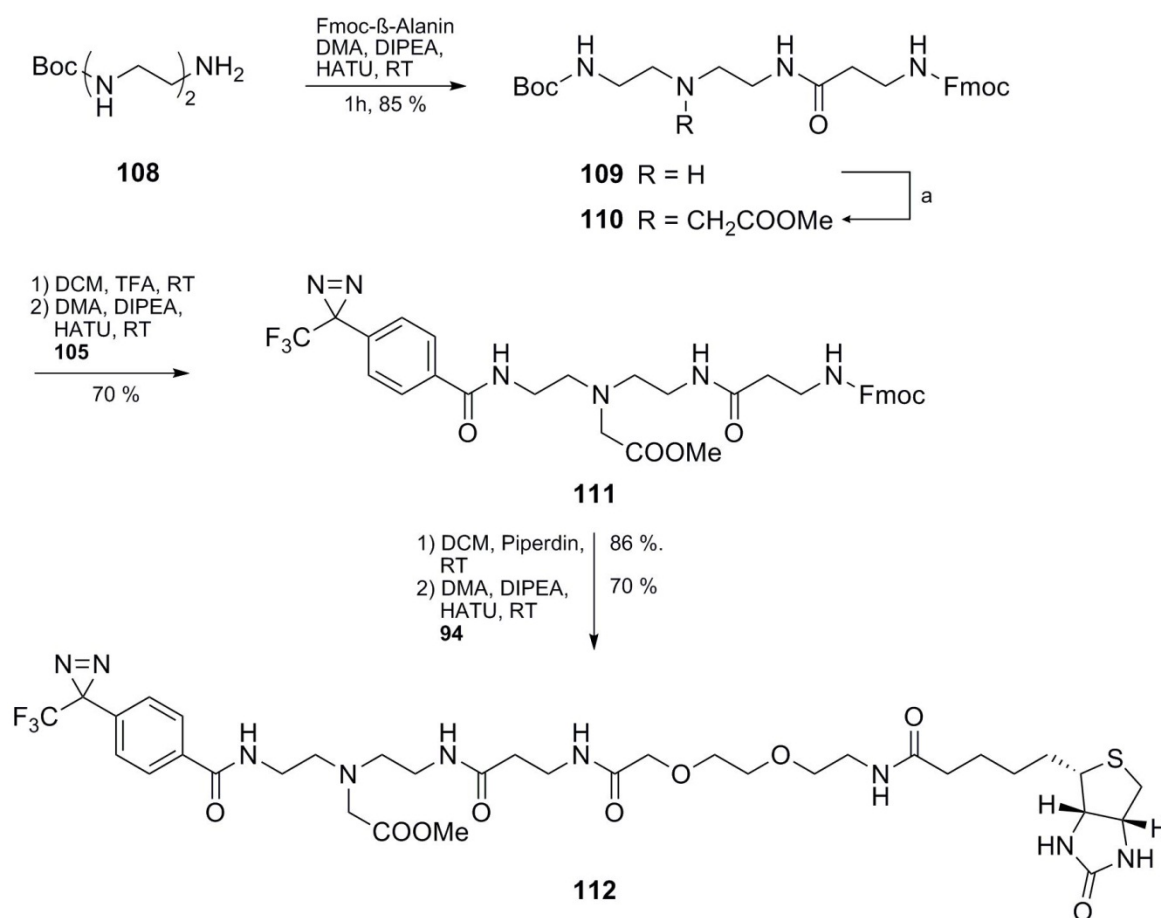


Schema 44: Darstellung des Scaffolds-Ethylester mit 1,4-Abstand

Die Amidbildung erfolgte mit HATU/DIPEA und lieferte den zentralen Scaffoldbaustein **106** in 67 % Ausbeute. Die Darstellung des kompletten Scaffolds gelang anschließend in einer weiteren Stufe. Nach Spaltung des Esters des Biotin-Linkers **98** erfolgte die Umsetzung mit Amin **106**. Die selektive Reaktion der freien Säure mit dem sekundären Hydrazin-Amin in **106** gelang in 62 % Ausbeute (Schema 44) und lieferte das Scaffold **107** als Ethylester.

3.4.4 Darstellung eines Amin-Scaffoldes mit 1,6-Abstand

Bei der Darstellung des Scaffoldes mit 1,6-Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und zentralem Stickstoff wurde von den kommerziell erhältlichen Bausteinen Fmoc- β -Alanin und dem mono-Boc geschütztem Diethylentriamin **108** ausgegangen. Durch die beiden Ethylenamineinheiten des Amins eignet sich der Baustein **108** sehr gut als zentraler Baustein, da die Trifunktionalität leicht durch Alkylierung des sekundären Amins erreicht werden konnte.



Schema 45: Darstellung des Scaffoldes mit 1,6-Abstand

a: MeCN, DIPEA, Methylbromacetat, 40 °C, über Nacht, 53%

Die beiden Edukte wurden in einer HATU vermittelten Peptidkupplung zu dem Intermediat **109** umgesetzt (Schema 45). Das zu 85 % erhaltene Peptid **109** wurde anschließend mit Methylbromacetat alkyliert, um die für ein vollständiges Scaffold notwendige Verzweigungsmöglichkeit für die Selektivitätsfunktion zu schaffen (Schema 45). Trotz des, mittels HPLC-MS detektierten, sehr guten Umsatzes von über 90 %, konnten nur 53 % nach der Chromatographie des tertiären Amins **110** isoliert werden. Die anschließende

Entschützung und Umsetzung des erhaltenen freien Amins mit der Diazirinbenzoesäure **105** lieferte die geschützte Scaffoldvorstufe **111** in 70 % Ausbeute (Schema 45). Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und chromatographischer Reinigung des freien Amins erfolgte die Umsetzung mit der zuvor synthetisierten Carbonsäure **94** (Schema 38) mit HATU/DIPEA. Nach Chromatographie wurden 70 % des geschützten Scaffoldes **112** isoliert (Schema 45).

3.4.5 Vergleich der UV-Spektren und Photoaktivierbarkeit

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Amin-Scaffolds besitzen alle ein aromatisches Diazirin als Reaktivitätsfunktion, welches jeweils über unterschiedliche Strukturelemente an den zentralen Stickstoff (fett dargestellt) angebunden ist (Abbildung 36). Die hergestellten Scaffolds weisen unterschiedliche Abstände zwischen dem Diazirin und dem Verzweigungselement auf. Dabei stellt **114** ein Stickstoffanalogon des herkömmlichen Scaffolds dar und Scaffold **115** weist einen ungewöhnlich langen (1,6) Abstand zwischen Reaktivitätsfunktion und Verzweigungsatom auf. In beiden Fällen wurde ein verändertes UV-Verhalten des Diazirins nicht erwartet, da auf beide Aromaten gleichermaßen der elektronenziehende Einfluss der Carbonylgruppe wirkt.

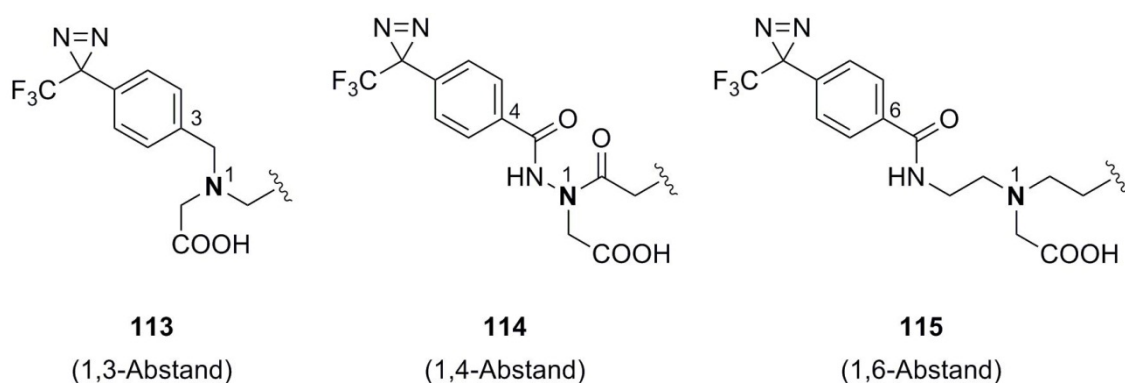


Abbildung 36: Struktureller Vergleich der dargestellten Amin-Scaffolds

Die Verbindung **113** weist eine strukturelle Besonderheit auf, die ihre Photoaktivierbarkeit beeinflussen sollte. Als einzige synthetisierte Verbindung beinhaltet sie keine Carbonylgruppe am Aromaten. Der fehlende elektronenziehende Einfluss sollte zu einer Verschiebung der UV-Absorptionsbanden führen.

Die wässrigen Lösungen der jeweiligen Verbindungen **113** – **115** wurden im UV-Bereich von 250 – 400 nm vermessen. Die aufgenommenen UV-Spektren aller drei Scaffolds weisen das typische Absorptionsmaximum von Diazirinen bei 350 nm auf (Abbildung 37). Die relativen Absorptionsmaxima bei ca. 350 nm sind geringfügig verschoben zu einander, was jedoch keinen Einfluss auf die spätere lichtinduzierte Aktivierung des Diazirins haben sollte, da das Emissionsmaximum der caproBox ebenfalls bei 350 nm liegt. Die erhaltenen Spektren der Scaffolds ließen auf eine optimale Aktivierung des Diazirins schließen. Ein verändertes photochemisches Verhalten wurde daraufhin nicht erwartet. Umso erstaunlicher waren die Ergebnisse, die durch die Analyse der durchgeführten UV-Stabilitätsexperimente erhalten wurden.

3 Ergebnisse

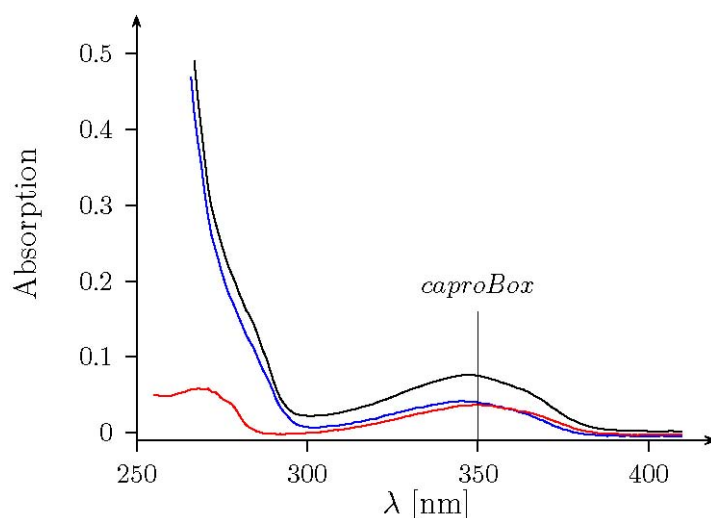


Abbildung 37: Vergleich der UV-Spektren dargestellter Amin-Scaffolds
schwarz: 1,6-Abstand, blau: 1,4-Abstand, rot: 1,3-Abstand,
 $c = 100 \mu\text{M}$

Dazu wurden die wässrige Proben der Scaffolds für 1 – 20 min in der caproBox ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) bestrahlt und anschließend mittels HPLC-MS analysiert. Durch die Bestrahlung mit $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ gelang die vollständige Aktivierung alle drei Scaffolds innerhalb von 5 min. Es wurden keine Unterschiede unter den einzelnen Scaffolds festgestellt. In allen Fällen konnte nur ein Photolyseprodukt detektiert werden, dass mit einer Massendifferenz von -10 m/z zum Ausgangsmaterial dem Additionsprodukt mit Wasser nach N_2 -Abspaltung entspricht. Die Bestrahlung mit UV-Licht mit $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ erbrachte jedoch unterschiedliche Ergebnisse.

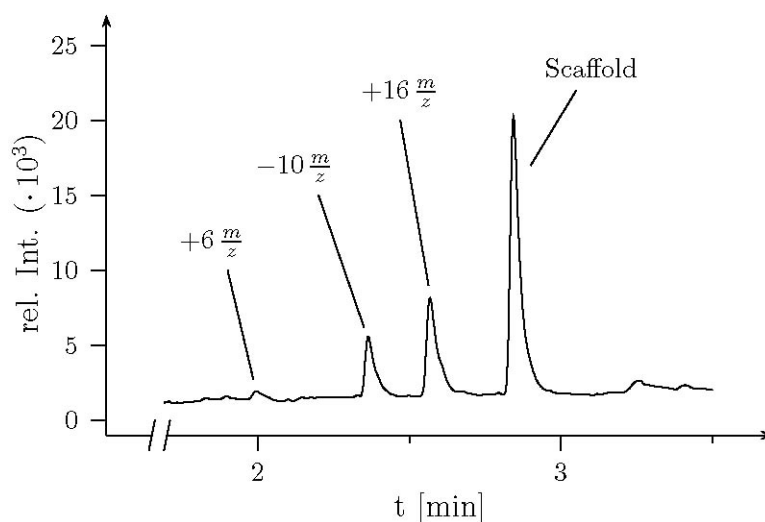
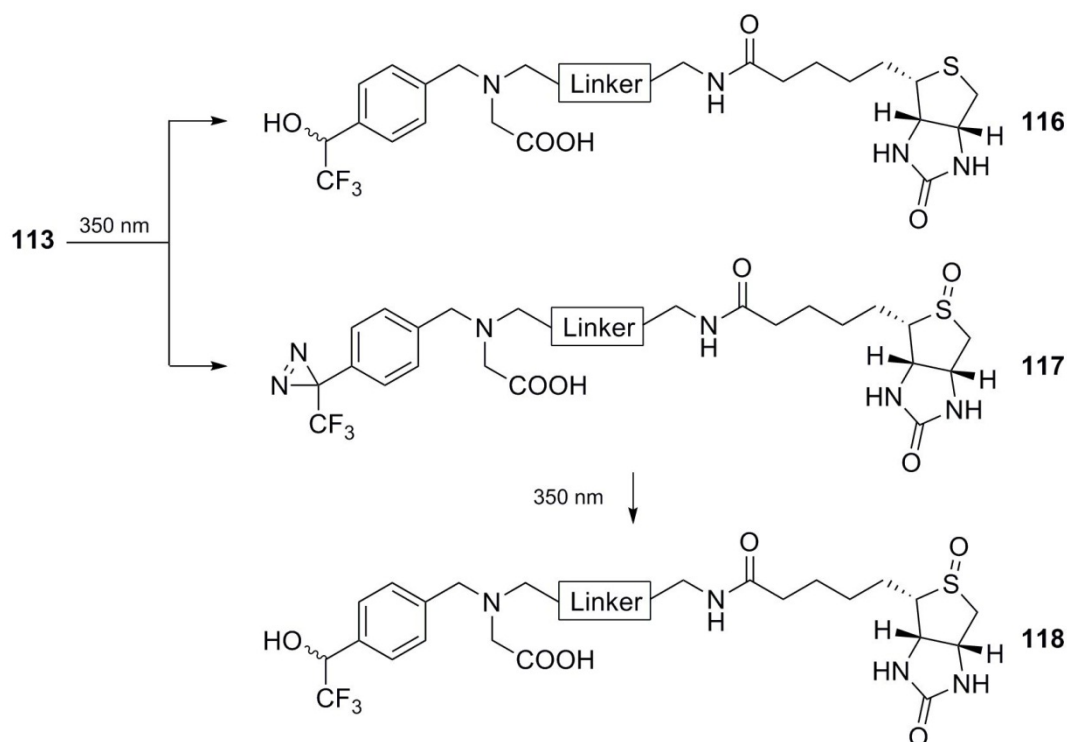


Abbildung 38: Abblitzstudie Amin Scaffold mit 1,3-Abstand
 $c = 50 \mu\text{M}$, Bestrahlzeit: 1 h, $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$

Konnten die Scaffolds **114** und **115** noch unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls innerhalb von 5 min vollständig aktiviert werden, gelang dies bei **113** nicht mehr. Selbst bei einer Belichtungsdauer von 1 h konnte nur ein Umsatz von ca. 50 % festgestellt werden. Zusätzlich wurde die Bildung zweier bisher nicht bekannten Photolyseprodukte beobachtet (Abbildung 38). Die Massendifferenz von +16 m/z zum Edukt spricht für ein Oxidationsprodukt. Innerhalb des Scaffolds ist der Schwefel des Biotins die oxidationsempfindlichste Stelle. So eine lichtinduzierte Oxidation des Scaffolds (wahrscheinlich des Schwefels im Biotin) konnte bisher in alle dargestellten Scaffolds nicht beobachtet werden.

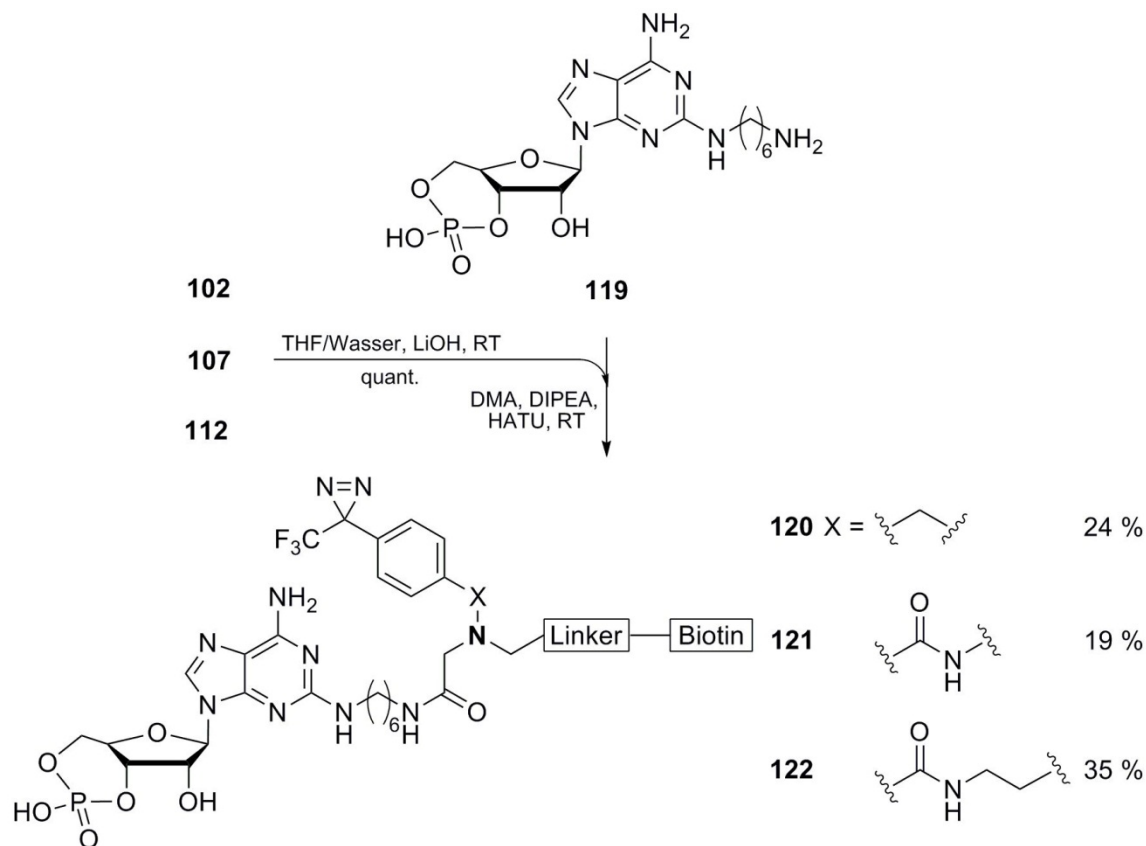


Schema 46: Postulierte Photolyseprodukte vom Amin-Scaffold mit 1,3-Abstand

Das Schema 46 zeigt drei postulierte Photolyseprodukte des Scaffoldes **113**, die anhand der erhaltenen MS-MS-Daten am wahrscheinlichsten erschienen. Neben dem erwarteten Diastereomerengemisch von **116** konnten auch Photolyseprodukte detektiert werden, in denen es zu erst zu einer Oxidation **117** und dann erst zu einer Aktivierung des Diazirins **118** gekommen ist. Durch diese abweichende photochemische Eigenschaft ist die Verwendung von UV-Licht mit einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ nicht möglich. Ein normales photochemisches Verhalten ist nur bei der Verwendung der energiereicheren UV-Strahlung von $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ zu erreichen. Dies erhöht jedoch die Gefahr der Zellschädigung bei empfindlichen Zelllinien, was einen wesentlichen Nachteil dieser Verbindung darstellt.

3.4.6 Darstellung der cAMP-CC

Aus den bereits in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Gründen, erfolgte die Synthese von CCs, die als Modellverbindungen dienten, ebenfalls mit cAMP als Selektivitätsfunktion. Jedoch wurde aufgrund der erzielten Ergebnisse mit verschiedenen cAMP-Derivaten^[11] ein cAMP-Derivat **119** mit einer anderen Anknüpfungsstelle als bei den bisher beschriebenen cAMP-CCs gewählt. Dazu wurden Ester **102**, **107** und **112** verseift.



Schema 47: Darstellung der cAMP-CCs

Die erhaltenen freien Säuren wurden anschließend mit verknüpfungsfähigem cAMP **119** zu den vollständigen cAMP Capture Compounds (**120** – **122**) mit HATU/DIPEA umgesetzt. Es wurden 19 – 35 % an cAMP-CCs isoliert (Schema 47).

3.4.7 Vergleichendes Capturen

Die Capture Experimente mit den Amin-CCs wurden im Hep-G2 Zelllysats durchgeführt. Da dieses komplexer als das *E.coli*-Lysat ist, sollten etwaige vorhandene Unterschiede im Captureverhalten deutlicher werden. Ansonsten wurde das Experiment wieder als On-Bead Variante durchgeführt. Dabei wurden die Beads zuerst mit der Capture Compound inkubiert und anschließend zu dem Zelllysats gegeben. Die Analyse des erhaltenen Gels erfolgte mittels anti-Biotin-Blot.

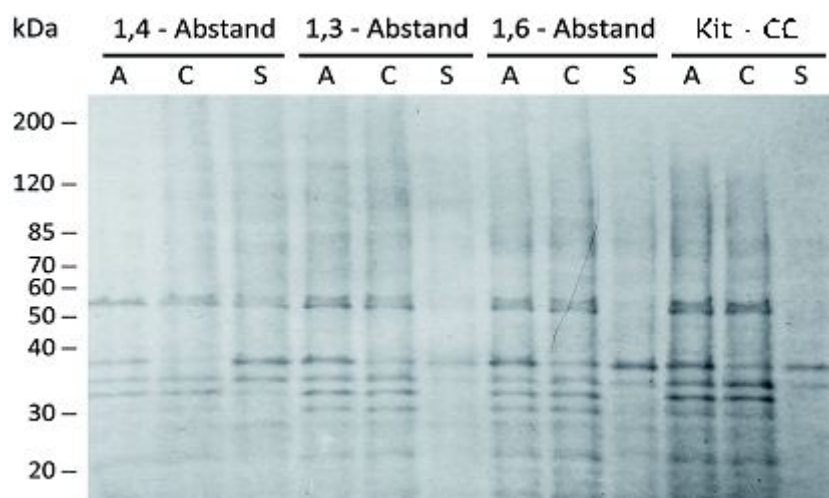


Abbildung 39: Capture-Ergebnisse der Amin-CCs mit 1,3- 1,4- u. 1,6-Abstand
A: Ansatz, C: Kompetition, S: Scaffold

Die im Lysat enthaltenen cAMP-bindenden Proteine sind die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase Typ I-alpha (43 kDa) und II-alpha (46 kDa). Sie sind im Blot nicht zu erkennen (Abbildung 39) und konnten erst durch die massenspektrometrische Analyse (Tabelle 6) identifiziert werden.

Tabelle 6: Capture-Ergebnisse der Amin-CCs mit 1,3- 1,4- u. 1,6-Abstand

	1,4			1,3			1,6			Kit		
Protein	A	C	S	A	C	S	A	C	S	A	C	S
I-alpha	5	1	1	3	0	0	5	0	0	5	0	0
	4	0	0	3	0	0	4	0	0	9	0	0
II-alpha	14	0	0	10	0	0	5	0	0	15	0	0
	11	0	0	9	0	0	2	0	0	11	0	0

Auswahlkriterien für die Analyse: min. Protein: 95%, Number of Peptides: 1, min. Peptides: 90%, dargestellt: Unweighted Spectrum Count^[75, 76]

Dargestellt in Tabelle 6 sind die aus zwei Analysenläufen erhaltenen Daten der jeweiligen Zielpoteine. Beide Proteine wurden fast vollständig kompetiert, was für ein erfolgreiches Capture Experiment spricht. Auch sind Tendenzen der einzelnen Verbindungen untereinander erkennbar. So ist kein Einfluss des zentralen Stickstoffes ersichtlich, da die Kit-Komponente teilweise identische Ergebnisse erbrachte, wie die Amin-Verbindung mit einem 1,4-Abstand. Die beiden anderen Abstände sind in beiden Fällen schlechter als der mittlere Abstand. Dieser Unterschied wird bei der cAMP-abhängigen Proteinkinase Typ II-alpha stärker deutlich als bei der cAMP-abhängige Proteinkinase Typ I-alpha.

3.4.8 Zusammenfassung

Es wurden drei Aminbasierende cAMP-CCs synthetisiert, die alle einen unterschiedlichen Abstand zwischen dem zentralen Stickstoff und der Reaktivitätsfunktion besitzen. Die jeweiligen Scaffolds zeigten teilweise ein unterschiedliches photochemisches Verhalten in der caproBox. So ließ sich das aromatische Diazirin in **113** bei 350 nm im Gegensatz zu **114** und **115** nicht vollständig aktivieren. In ersten Capture Experimenten konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Isolierung des Zielpoteins zwischen Kohlenstoff und Stickstoff als Zentralatom und nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Abständen zwischen Zentralatom und Reaktivitätsfunktion festgestellt werden. Eine weitere und genauere Untersuchung und vergleichende Experimente der verschiedenen Amin-CCs finden zurzeit noch in der Abteilung Biochemie im Rahmen einer Diplomarbeit statt.

3.5 Verwendung von Photo-Aminosäuren als Reaktivitätsfunktion

Um die Anwendungsmöglichkeit von aliphatischen Diazirinen, und somit sterisch anspruchslösen Reaktivitätsfunktionen im Rahmen der CCMS-Technologie zu evaluieren, wurden Scaffolds aufgebaut, die ein aliphatisches Diazirin als Reaktivitätsfunktion beinhalten. Kommerziell erhältliche aliphatische Diazirine sind in den beiden Photo-Aminosäuren Photo-L-Leucin und Photo-L-Methionin enthalten.

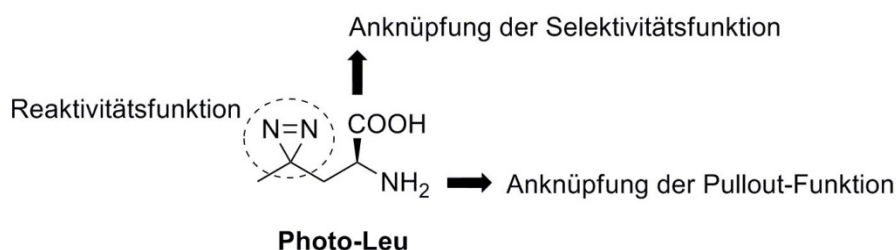


Abbildung 40: Photo-Aminosäuren in Scaffolds

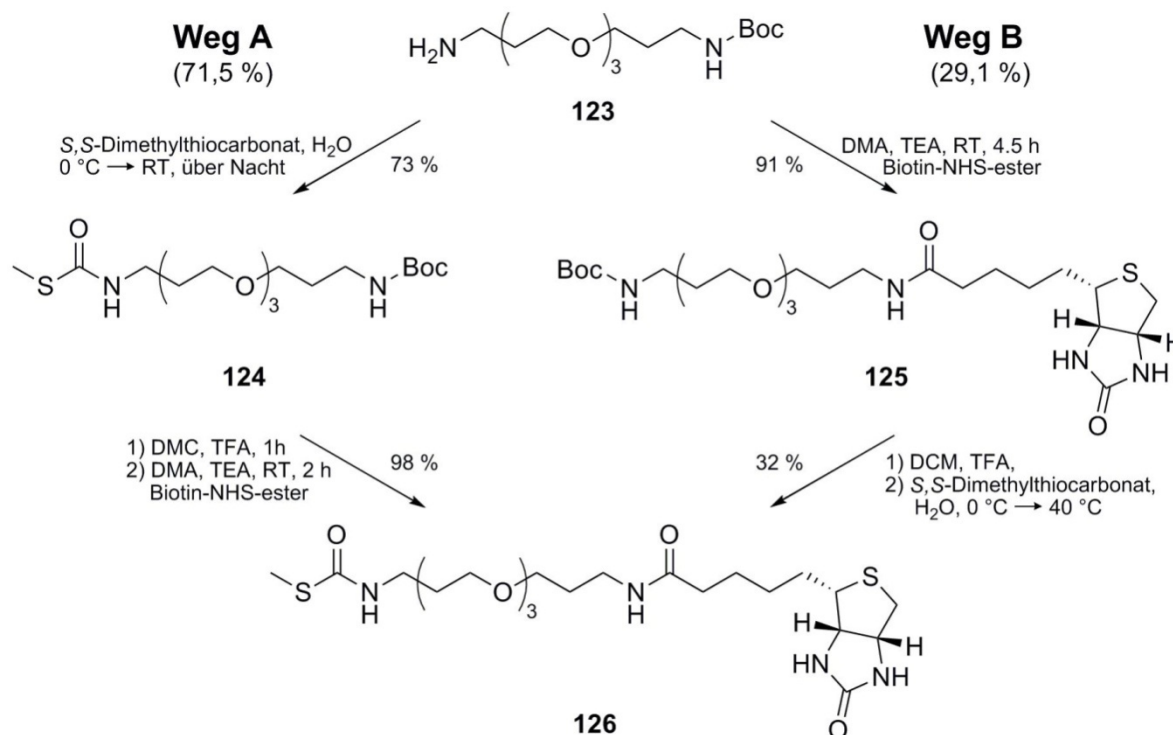
Da Photo-Aminosäuren von sich aus trifunktional sind (Diazirin, Carbonsäure und Amin, siehe Abbildung 40), sind sie ideal dazu geeignet, nicht nur als Reaktivitätsfunktion, sondern gleichzeitig auch als zentrales Verzweigungselement in einem Scaffold integriert zu werden. Die Carboxylgruppe der Aminosäuren soll die Möglichkeit geben, die Selektivitätsfunktionen über einen, auf ein primäres Amin endender Linker über eine Amidbindung anzuknüpfen. Die Anknüpfung des Biotins als Pullout-Funktion erfolgte über das freie Amin des Linkers.

3.5.1 Scaffoldsynthese

Für die Darstellung der auf Photo-Aminosäuren-basierenden Scaffolds wurde von dem mono-Boc-geschützten Diamin-Linker **123** ausgegangen. Es wurden zwei mögliche Wege zum Aufbau der Scaffoldvorstufe, dem Thiolo-carbamat **126** untersucht. Thiolo-carbamate bieten eine gute Möglichkeit, zwei unterschiedliche primäre Amine miteinander verknüpfen zu können^[83, 84]. In beiden untersuchten Wegen ist der entscheidende Schritt die Bildung des Thiolo-carbamates. Hierbei variierten die erhaltenen Ausbeuten der entsprechenden Thiolo-carbamates **126** und **124** stark zueinander (Schema 48). Die Ausbeute von 32 % an **126** konnte trotz vorsichtigem Erwärmen nicht erhöht werden (Weg B). Auf ein stärkeres Erwärmen wurde verzichtet, da dies zur Reaktion des sich schon gebildete Thiolo-carbamates

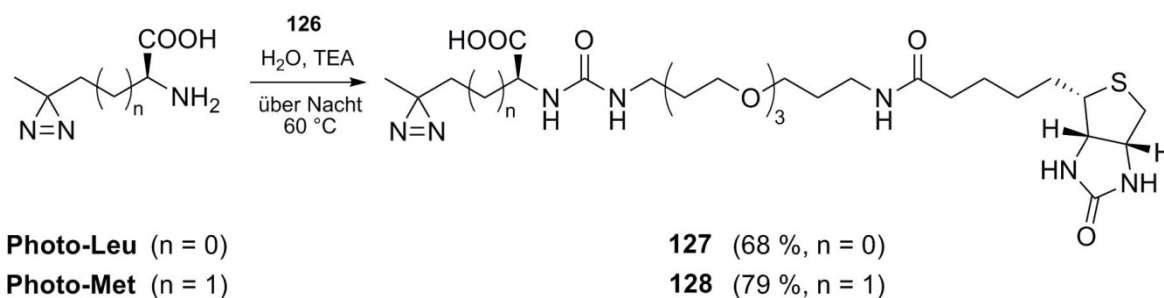
3 Ergebnisse

mit noch freiem Amin zum symmetrischen Harnstoff geführt hätte^[83, 84]. Die Darstellung des Thiocarbamates **124** gelang hingegen bei Raumtemperatur bis zu über 70 %.



Schema 48: Darstellung des Thiocarbamates über 2 Wege

Die anschließende Umsetzung des freienamins mit NHS-aktiviertem Biotin erfolgte annähernd quantitativ. Dadurch wurde über den Weg A eine Gesamtausbeute an Thiocarbamat **126** von 71.5 % erreicht. Über den Weg B betrug die Gesamtausbeute 29.1 %. Somit ist die Synthese von **126** über den Weg A deutlich effizienter, obwohl nur eine Vertauschung der zwei wesentlichen Stufen vorgenommen wurde.



Schema 49: Synthese der Photo-Aminosäure-Scaffolds

Für die anschließende Darstellung von Scaffolds wurde das in Schema 48 dargestellte Thiocarbamat **126** mit den käuflich erhältlichen Photoamino säuren L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin nach Literaturangaben umgesetzt (Schema 49)^[83, 84]. Die Synthese der

beiden Scaffolds **127** und **128** erfolgte in guten Ausbeuten von 68 bzw. 79 %. Anknüpfung des Biotins als Pullout-Funktion erfolgte über das freie Amin des Linkers.

3.5.2 Untersuchung der UV-lichtinduzierten Aktivierung des Diazirins

Um zu untersuchen, inwieweit aliphatische Diazirine als Reaktivitätsfunktion in einem Capture-Experiment vergleichbar mit den aromatischen Diazirinen sind, wurden die photochemischen Eigenschaften in der caproBox der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Scaffolds **127** und **128** untersucht. Dazu wurden beide Scaffolds unter Standardbedingungen in der caproBox als wässrige Lösung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 310$ nm und $\lambda_{\max} = 350$ nm für unterschiedliche Zeiten bestrahlt. In beiden Fällen ließen sich die Verbindungen aktivieren und lieferten erklärbare Photolyseprodukte. Jedoch war die benötigte Zeit bei 310 nm doppelt so lang wie bei der Verwendung von 350 nm. Da kein Chromophor vorhanden ist, der wie bei den bisherigen Scaffolds kurzwelliges UV-Licht absorbieren kann, muss möglichst exakt auf das Absorptionsmaximum des Diazirins (350 nm) eingestrahlt werden. Dies gelang nur bei der Verwendung von Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 350$ nm.

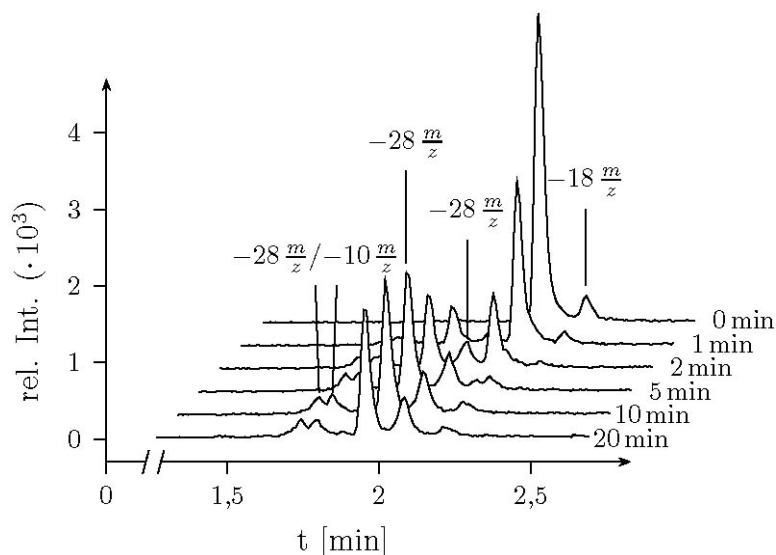


Abbildung 41: Ablitzstudie Photo-Leucin-Scaffold

$c = 32 \mu\text{M}$, $T = 1 - 4^\circ\text{C}$, Bestrahlungsdauer:

0 – 20 min, $\lambda_{\max} = 350$ nm, $V = 100 \mu\text{l}$,

1 – 5 siehe Tabelle 3.7

Abbildung 41 zeigt die übereinander gelegten Massenspektren des Photo-Leucin-Scaffolds **127** nach Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 350$ nm. Diese wurden exemplarisch für alle Experimente dargestellt, da die erhaltenen Produkte identisch mit denen

3 Ergebnisse

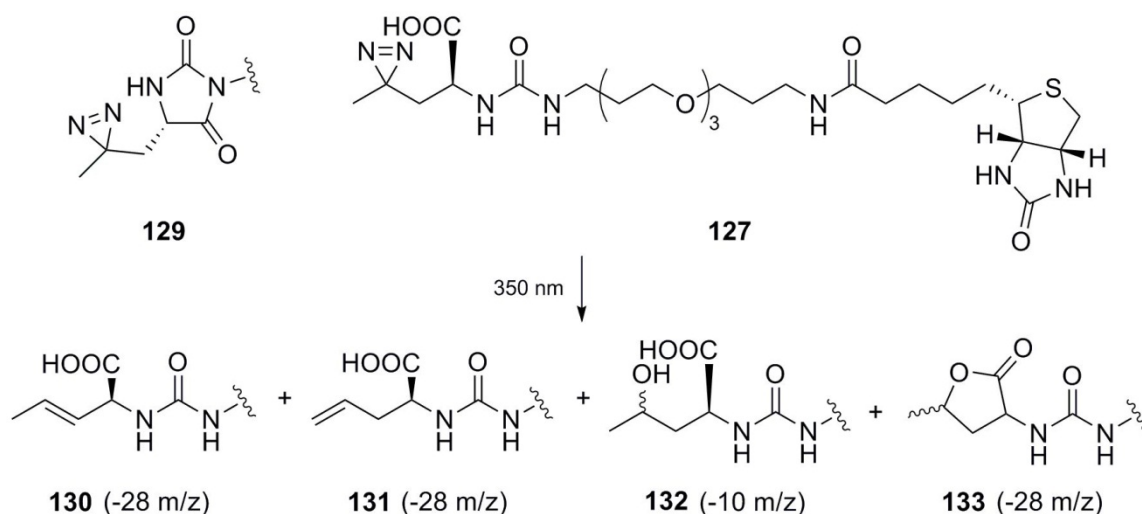
bei 310 nm waren. Die erhaltenen Produkte besaßen dieselben Massendifferenzen zum Edukt (Tabelle 3.7), die auch bei dem Photo-Methionin-Scaffold **128** beobachtet wurden. Es wurde davon ausgegangen, dass die zugrunde liegenden Photolysereaktionen identisch denen des Photo-Methionin-Scaffold **128** sind. Insgesamt wurde bis zu 20 min bestrahlt, jedoch waren die erhaltenen Ergebnisse nach 10 und 20 min mit denen nach 5 min identisch (Abbildung 41). Die erhaltenen Massen und Retentionszeiten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Abblitzprodukte von **127** nach Bestrahlung bei 350 nm

Peak Nr.	Retentionszeit [min]	Massenshift [m/z]
1	1.74	- 28, -10
2	1.81	- 28, -10
3	1.95	- 28
4	2.08	- 28
5	2.33	- 18 ^a

^a Cyclisierungsprodukt

Bei den erhaltenen Spektren ist das Produkt bei 2.33 min (Peak Nr. 5) nur von untergeordnetem Interesse. Dabei handelt es sich um das Nebenprodukt **129**, das infolge einer intramolekularen Cyclisierungsreaktion, ähnlich der im Schema 14 beschriebenen, gebildet wurde. Diese ist nicht photochemisch induziert und konnte bereits nach Lagerung bei 1 – 4 °C beobachtet werden. Bei den erhaltenen Photolyseprodukten (Peak 1 – 4) fällt auf, dass sie dieselbe Masse haben. Zusätzlich konnte in den Peaks 1 und 2 noch mindestens eine weitere Verbindung mit einer Massendifferenz von -10 m/z zum Edukt nachgewiesen werden.



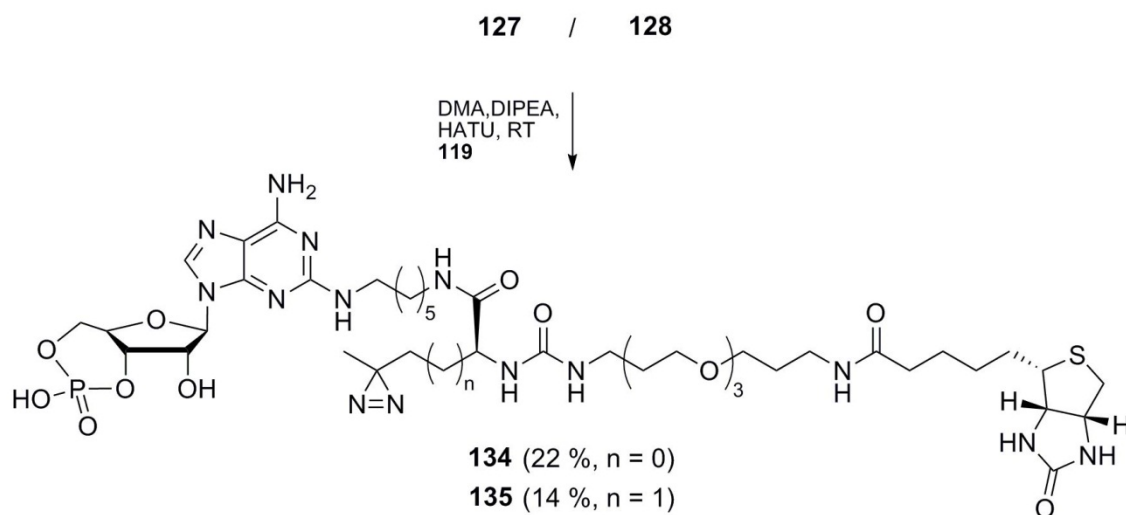
Schema 50: Photolyse von Scaffold **127** und mögliche Folgeprodukte

Schema 50 zeigt die entstehenden Folgeprodukte der Photolyse von Scaffold **127**. Photolyseprodukte des beschriebenen Cyclisierungsproduktes **129** sind nicht beobachtet worden. Ein möglicher Grund ist eine zu geringe Konzentration dieser Photolyseprodukte. Das beschriebene Belichtungsexperiment wurde in einem größeren Maßstab wiederholt. Im Anschluss wurde eine chromatographische Trennung mittels einer präparativen HPLC der erhaltenen Photolyseprodukte durchgeführt. Eine Isolierung jedes einzelnen Photolyseproduktes gelang nicht. Trotzdem gelang die NMR-spektroskopische Identifizierung von allen in Schema 50 aufgeführten Photolyseprodukten. Davon sind **130** und **131** erwartet worden und wurden bereits vor 20 Jahren als Photolyseprodukte aliphatische Diazirine beschrieben^[24]. Diese Alkene entstehen durch einen 1,2-H-Shift des zum Carben α -ständigen Protons. Diese Folgereaktion von aliphatischen Diazirinen stellt einen systematischen Nachteil gegenüber den aromatischen Diazirinen dar. Der 1,2-H-Shift erfolgt jedoch nur wenn das Carben nicht innerhalb seiner Lebenszeit vor der Umlagerung mit einem nucleophilen Reaktionspartner (z.B. Wasser, Protein) reagiert. Kommt es zu einer solchen Reaktion, bildet sich ein sekundärer Alkohol (Alkohol **132**), bei dem zu erwarten ist, dass er als diastereomeres Gemisch vorliegt. In einer Folgereaktion können diese Alkohole mit der α -positionierten Carbonsäure zu Lactonen weiterreagieren. Diese Lactone haben dieselbe Masse wie die schon zuvor erwähnten Alkene. Diese Folgereaktion kann bei einer vollständigen Capture Compound nicht auftreten, da diese keine freie Säure mehr besitzt. Beim Photo-Methionin-Scaffold **128** wurden nur drei Produkte mit einem Massenshift von -28 m/z zum Scaffold detektiert. Eine Erklärung ist, dass der gebildete Sechsring thermodynamisch ungünstiger ist als der Fünfring **129** ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich beide dargestellten Photo-Aminosäure-Scaffolds (**127** und **128**) innerhalb von 5min vollständig mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 350\text{ nm}$ anregen lassen. Die erhaltenen Photolyseprodukte sind erklärbar, was auf eine kontrollierte Photochemie schließen lässt. Eine kontrollierte und vorhersehbare Photochemie ist äußerst wichtig für ein erfolgreiches Capture Experiment. Durch die verwendete Wellenlänge wird auch die Probe mit weniger Energie als bisher bestrahlt, was die Gefahr einer potentiellen Schädigung des biologischen Materials verringert.

3.5.3 Synthese der Capture Compounds

Die Synthese der cAMP-Capture Compounds als Modellverbindungen erfolgte dem Schema 51 entsprechend analog zu den schon zuvor gezeigten Synthesen von Capture Compounds.



Schema 51: Synthese von cAMP-Capture-Compounds

Die erhaltenen Ausbeuten lagen im niedrigen Bereich von 14 – 22 %. Die Ansatzgröße wurde so gewählt, dass bei den erwarteten niedrigen Ausbeuten genug Material für erste biochemische Experimente vorhanden war. So konnten ausreichende Mengen an CCs für eine Machbarkeitsstudie synthetisiert werden.

3.5.4 Vergleichendes Capturen

Für vergleichende Capture Experimente wurde die Photo-Methionin-CC 135 im Hep-G2-Zelllysate nach dem Standard-On-Bead Verfahren getestet^[11]. Parallel zu der neuartigen Capture Compound wurde auch mit der käuflich erhältlichen cAMP-CC (Kit-CC), die ein aromatisches Diazirin trägt, gearbeitet. Dadurch wurde ein direkter Vergleich zwischen einem aromatischen und einem aliphatischen Diazirin erhalten. Einziger Unterschied zu dem bisherigen Protokoll war, dass die Belichtung in der caproBox auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse der Abblitzuntersuchungen mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ erfolgte. Im Hep-G2-Lysat konnten beide cAMP-bindenden Proteine, die regulatorischen Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinasen Typ I-alpha (43 kDa) und II-alpha (46 kDa) hochspezifisch isoliert und nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die über eine Doppelbestimmung erhaltenen Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in Bezug

3 Ergebnisse

auf die Isolierung der Zielproteine zwischen der aliphatischen und der aromatischen Reaktivitätsfunktionen. Weshalb im zweiten Experiment mit der Kit-CC die Kompetition nur unzureichend gelang, konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 8: Vergleich des Captureverhaltens von cAMP-Photo-Aminosäure-CC vs. Kit-CC in Hep-G2

Protein	135		Kit-CC		135		Kit-CC	
	A	C	A	C	A	C	A	C
I-alpha	10	0	14	0	15	0	19	17
II-alpha	22	0	29	0	27	0	35	27

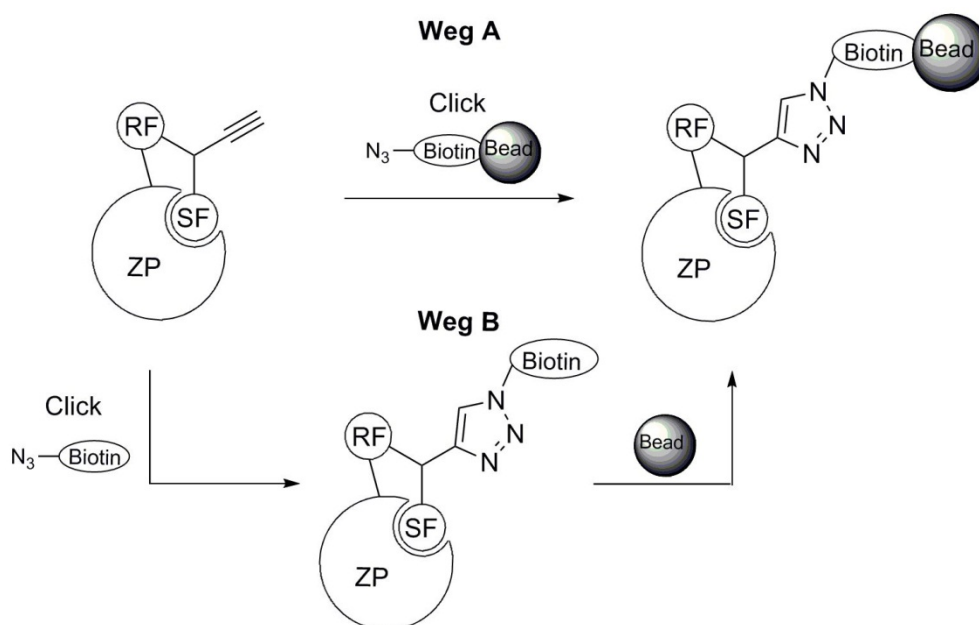
A: Ansatz, C: Kompetition, Auswahlkriterien: min. Protein: 95%, Number of Peptides: 1, min. Peptides: 90%, dargestellt: Number of Unique Peptides^[75, 76]

3.5.5 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass aliphatische Diazirine als Reaktivitätsfunktionen in Capture Compounds zur Isolierung von Proteinen erfolgreich eingesetzt werden können. Jedoch besitzen aliphatische Diazirine einen systematischen Nachteil gegenüber ihren aromatischen Derivaten. Die durch Bestrahlung mit UV-Licht gebildeten Carbene unterliegen teilweise einem 1,2-Protonenshift, der zur ihrer Deaktivierung führt und bei aromatischen Diazirinen nicht beobachtet wurde. Eine weitere und genauere Untersuchung und vergleichende Experimente der Photo-Aminosäuren basierenden CCs in biologischen Experimenten finden zurzeit noch in der Abteilung Biochemie im Rahmen einer Diplomarbeit statt.

3.6 Clickfähige Scaffolds & Capture Compounds

Die bereits in der Einleitung vorgestellte Variante der Click-Chemie, die 1,3-Dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin, schafft die Möglichkeit, ein alternatives Pulloutsystem zu entwickeln, das mehrere Vorteile gegenüber dem herkömmlichen Biotin-Streptavidin besitzt. Werden die Magnetbeads bereits separat mit einem azidtragenden Biotinlinker inkubiert und danach erst dem Zelllysats hinzugesetzt, sollten keine endogen biotinylierten Proteine nicht mitisoliert werden (Schema 52, Weg A).

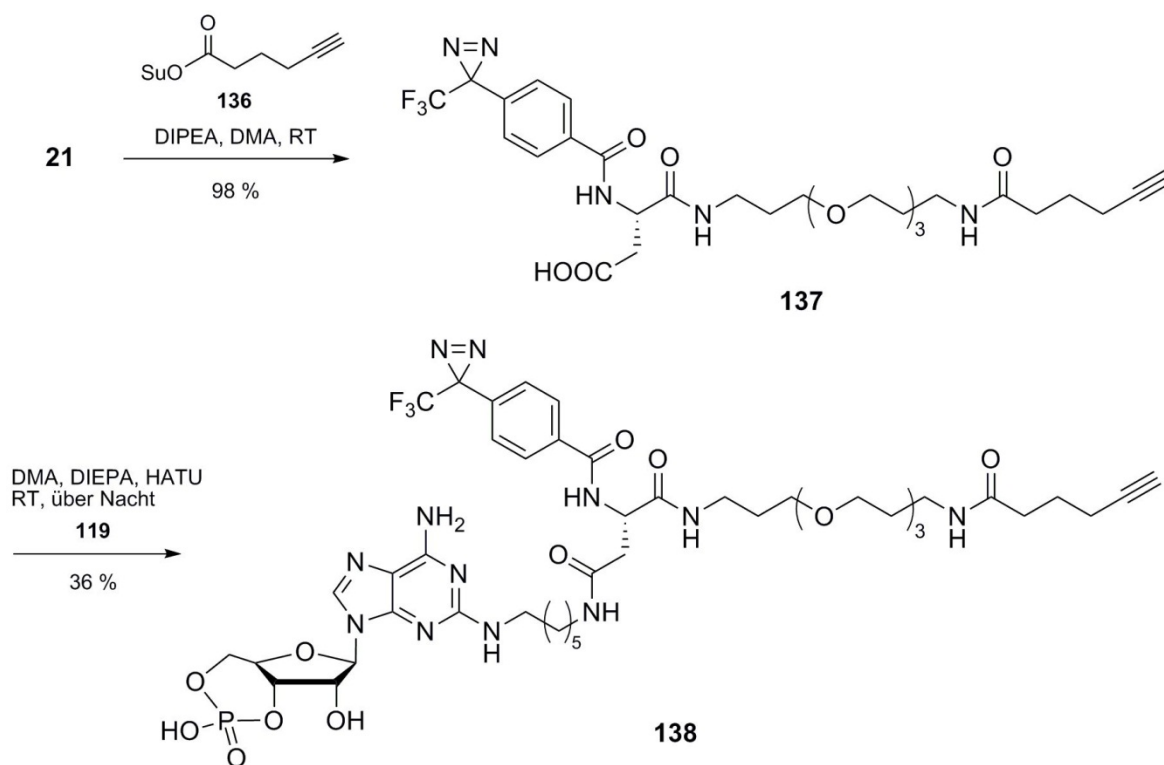


Schema 52: Schematische Darstellung eines Click-CC-Experimentes

Über den Weg B ist dieser Vorteil nicht mehr vorhanden, da erst nach der Click-Reaktion die Beads hinzugesetzt werden. Trotzdem wurde im Rahmen dieser Arbeit Weg B untersucht. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Click-Reaktion in Lösung (Schema 52, Weg B) besser zur Etablierung eines Referenzsystems eignet, als die Click-Reaktion an der festen Phase (Schema 52, Weg A). Bei erfolgreicher Etablierung des Click-Systems, sollte die Erweiterung zu Weg A vorgenommen werden. Von beiden Möglichkeiten unabhängig ist die Alkin-Funktion sterisch sehr anspruchslos und benötigt keinen langen Linker für eine erfolgreiche Cycloaddition, was die Synthese von sehr kleinen und dadurch möglicherweise zellgängigen Verbindungen gestattet.

3.6.1 Synthese von clickfähigen Capture Compounds

Bei der Synthese von einem ersten clickfähigen Scaffold wurde von der Scaffoldvorstufe **21** (Schema 14) ausgegangen^[12] und dieses mit der NHS-aktivierten Carbonsäure **136**^[85] umgesetzt (Schema 53).



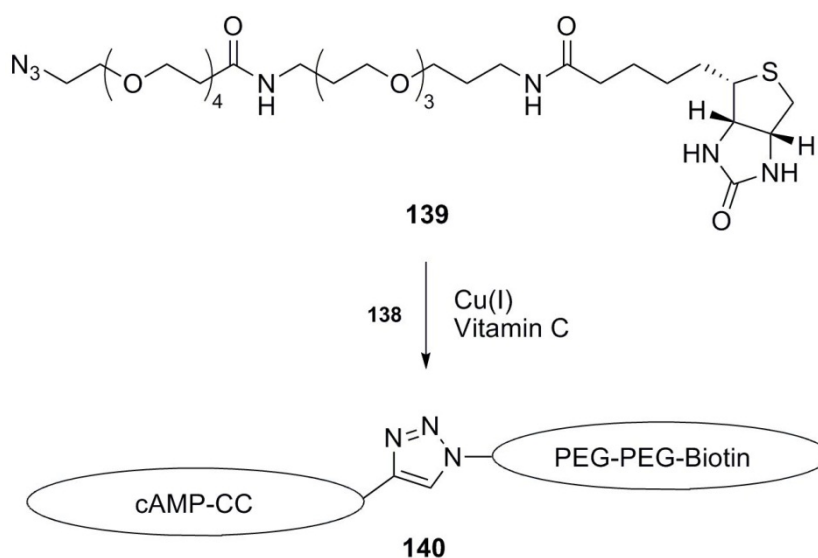
Schema 53: Synthese eines Clickfähigen Scaffolds & Capture Compound

Durch die Verwendung des NHS-Esters bei der Einführung eines Alkins gelang der Aufbau des Scaffolds **137** in einer Stufe ohne die Verwendung von Schutzgruppen in annähernd quantitativer Ausbeute (Schema 53). Im folgenden Schritt erfolgte die Darstellung einer cAMP-CC analog den schon beschriebenen Kupplungsbedingungen mit HATU/DIPEA. Um das neue Click-basierende Scaffold mit den herkömmlichen Biotin-Scaffolds optimal vergleichen zu können, wurde das Click-Scaffold **137** mit PEG-Linker synthetisiert. Für eine spätere strukturelle Optimierung eines Click-Scaffolds ist die Synthese ohne einen PEG-Linker sehr leicht möglich. Mit der dargestellten CC **138** wurde in Vorversuchen in der Abteilung Biochemie getestet, ob eine Isolierung eines Zielproteins mittels der Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition möglich ist. Diese verliefen erfolgreich, jedoch waren die erzielten Ergebnisse noch deutlich schlechter als die mit dem herkömmlichen Biotin-Streptavidin-System. Um diese Ergebnisse so weit verbessern zu können, dass das Click-System einen gleichwärtigen Ersatz zum Biotin-Streptavidin-System darstellt, wurde im folgenden

Abschnitt an einer Optimierung der Click-Bedingungen gearbeitet. Dabei wurde insbesondere Wert darauf gelegt, die Reaktionsbedingungen so weit wie möglich denen im biochemischen Experiment vorherrschenden Bedingungen anzupassen.

3.6.2 Optimierung der Click-Reaktion

Eine Optimierung der Kupfer(I)-katalysierten Click-Reaktion^[43] war nötig, da diese in wässrigem Medium ohne organischen Anteil erfolgen soll. Die Verwendung von organischen Lösemitteln im Zelllysatschließt sich aus, da enthaltene Proteinen nur unter definierten gepufferten wässrigen Systemen stabil sind. Die meisten beschriebenen Click-Reaktionen erfolgen entweder in einem organischen Lösemittel^[86] oder in wässrigen Systemen mit einem Anteil an organischem Lösemittel, wie DMSO, EtOH, DMF, ^tBuOH^[87, 88, 89]. Nur wenige Click-Reaktionen sind im wässrigen Medium ohne ein organisches Lösemittel beschrieben^[49, 90]. Für die Optimierungsreaktionen wurde als Reaktionspartner zur synthetisierten cAMP-CC **138**, der schon in ersten biochemischen Experimenten eingesetzte und kommerziell erhältliche Biotin-Azid-Linker **139** verwendet (Schema 54).



Schema 54: Umsetzung einer clickfähigen cAMP Capture Compound mit einem Azid

Sämtliche im Folgenden vorgestellten Experimente wurden aus den zuvor beschriebenen Gründen in Wasser bzw. in gepufferten wässrigen Lösungen ohne ein organisches Lösemittel durchgeführt, was für eine spätere Anwendung der gefundenen Bedingungen in der Biochemie sehr wichtig war. Zu Beginn erfolgten die Versuche noch in Abwesenheit von

Salzen und anderen, im biochemischen Experimente notwendigen Reagenzien. Es wurde der Einfluss von:

- Kupferkonzentrationen
- Kupfer(II) vs. Kupfer(I)
- Ligand für die Stabilisierung von Kupfer(I)
- Temperatur (4 °C, RT, 37 °C)
- Zeit

untersucht. Dabei wurde das Molverhältniss von Azid zu Alkin (2:1) in allen Fällen belassen und Natriumascorbat als Reduktionsmittel für das Kupfer(II) in einem min. 30fachen Überschuss eingesetzt. Die Konzentration wurde mit 33 μ M (Alkin) bzw. 66 μ M (Azid) so gewählt, dass die Reaktion ohne weiter Zwischenschritte direkt mittels HPLC-MS überprüft werden und der Umsatz bestimmt werden konnte.

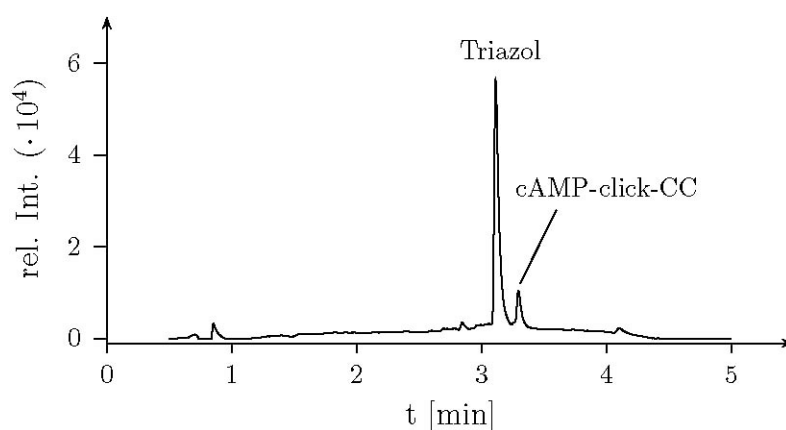


Abbildung 42: Beispiel der Reaktionskontrolle einer Click-Reaktion mittels HPLC-MS

Dazu wurde über das Verhältnis der UV-Signale (254 nm) von Produkt **140** (Triazol) und Edukt **138** (cAMP-click-CC) der Umsatz der Reaktion bestimmt (Abbildung 42, hier: 9:1). Da sämtliche Reaktionen in 200 μ l-Gefäßen durchgeführt wurden, war ein Rühren der Reaktion nicht mehr möglich, sie wurden anstelle dessen geschüttelt. Dabei wurde festgestellt, dass das Schütteln der Reaktionslösung unerlässlich für hohe Umsätze ist. Ohne Schütteln war ein Umsatz von über 50% nicht zu erreichen. Tabelle 9 zeigt die ersten Ergebnisse, in denen die Abhängigkeit des Umsatzes von einer kräftigen Durchmischung deutlich wird. Es hat sich gezeigt, dass trotz einer 90 min längeren Reaktionsdauer, der Umsatz ohne Schütteln nur 12% betrug (Tabelle 9, Eintrag 1). Wird unter ansonsten gleichen Bedingungen die Reaktion geschüttelt, konnten in kürzerer Zeit fast quantitative Umsätze erzielt werden (Tabelle 9, Eintrag 2).

3 Ergebnisse

Tabelle 9: Untersuchte Click-Bedingungen - Voruntersuchungen

Eintrag	t [min]	Umsatz [%]
1	120	12 ^a
2	30	99

33 μM **138**, 66 μM **139**, 0.1 Äquiv. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,
3.0 Äquiv. Natriumascorbat, Raumtemperatur,

^a Reaktion wurde nicht geschüttelt

Da sich das Schütteln der Reaktion als essentiell für hohe Umsätze gezeigt hat, wurden alle folgenden Reaktionen ebenso stark geschüttelt. In weiteren Experimenten wurde neben der Reaktionstemperatur (je nach biochemischer Fragestellung) und -zeit auch der Einfluss der Kupferkonzentration untersucht.

Tabelle 10: Click-Bedingungen - Temperatur, Zeit, Kupferkonzentration

Eintrag	Kupfer [Äquiv.]	T [°C]	t [min]	Umsatz [%]
1	2	37	60	67
2	0.1	37	60	44
3	0.1	37	60	88 ^a
4	0.1	37	60	99 ^b
5	2	4	100	68
6	0.1	4	8	70
7	0.1	4	24	85
8	0.1	4	30	93 ^c
9	0.1	4	45	98
10	0.05	4	60	93
11	0.01	4	60	10

33 μM **138**, 66 μM **139**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3.0 Äquiv. Natriumascorbat, ^a 30 Äquiv. Natriumascorbat, ^b 300 Äquiv. Natriumascorbat, ^c Durchschnittswert über mehrere Versuche

Bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit fiel auf, dass die Reaktion bei 37 °C (Reaktionstemperatur bei der späteren potentiellen Anwendung in bzw. an lebenden Zellen) entgegen der Erwartung mit schlechteren Umsätzen verlief. Die erzielten Umsätze waren unabhängig von der verwendeten Kupferkonzentration mit 44 – 67 % deutlich geringe als bei Raumtemperatur (Tabelle 10, Einträge 1 u. 2). Erst bei einer drastischen Erhöhung des Überschusses an Natriumascorbat von 3.0 Äquiv. auf 30 Äquiv. (Tabelle 10, Eintrag 3) bzw. 300 Äquiv. (Tabelle 10, Eintrag 4) wurde annähernd quantitativer Umsatz erzielt. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die erhöhte Temperatur die Reoxidation des Cu(I) zum Cu(II) deutlich schneller erfolgt und somit nicht mehr ausreichend Cu(I) für den

Katalysekreislauf zur Verfügung steht. Eine Durchführung in entgasten Lösungen unter Inertgas als Alternative ist jedoch aus biochemischer Sicht nicht praktikabel. Durch eine Verringerung der Temperatur auf 4 °C wurden bei den untersuchten Kupferkonzentrationen ähnliche Umsätze (Tabelle 10, Einträge 5 – 9) erreicht wie vorher schon bei Raumtemperatur. Gleichzeitig erfolgte eine Analyse der Reaktionszeit. Es wurde bereits nach 8min ein Umsatz von 70 % festgestellt (Tabelle 10, Eintrag 6). Diese erhöhte sich innerhalb von 24 – 30 min auf 85 % bzw. durchschnittlich 93 % (Tabelle 10, Einträge 7 u. 8). Es hat sich gezeigt, dass die beste Ausbeute der Click-Reaktion mit 0.1 Äquiv. Kupfer erreicht wurden. Wurde die Konzentration des Kupfers auf 0.05 Äquiv. (5 mol%) verringert, konnte noch annähernd sehr guter Umsatz erzielt werden. Dieser verringert sich jedoch auf 10% bei einer Kupferkonzentration von 0.01Äquiv (Tabelle 10, Einträge 10 u. 11).

Um die benötigten Reagenzien möglichst zu begrenzen, wurde untersucht, inwieweit sich die Click-Reaktion ohne Natriumascorbat als Reduktionsmittel und einem Kupfer(I)-Salz durchführen lässt.

Tabelle 11: Click-Bedingungen - Cu(II) vs. Cu(I)

Eintrag	Kupfer [Äquiv.]	t [min]	Umsatz [%]
1	2	68	87
2	0.1	60	0
3	2 ^a	90	91
4	0.1 ^a	90	53

33 µM **138**, 66 µM **139**, [Cu(MeCN)₄]BF₄, Raumtemperatur,
^a + 3.0 Äquiv. Natriumascorbat

Dies ist prinzipiell möglich, jedoch sind dazu stöchiometrische Mengen des Kupfer(I)-Salzes notwendig (Tabelle 11, Eintrag 1). Die hohen Umsätze konnten jedoch nur ansatzweise erreicht werden. Bei der Verwendung von 0.1 Äquiv. an Kupfer konnte kein Umsatz beobachtet werden. Erst in Anwesenheit von Natriumascorbat (3.0 Äquiv.) (Tabelle 11, Einträge 3 – 4) konnten die Ausbeuten erhöht bzw. bei 0.1 Äquiv. Kupfer überhaupt Umsatz erzielt werden. Da ein Reduktionsmittel trotz Verwendung von Cu(I) notwendig ist und die damit erzielten Ergebnisse trotzdem schlechter als bisher sind, ist dieses Cu(I)-Salz keine Alternative.

Bei der Anwendung der Cu(I)-katalysierten Cycloaddition in biochemischen Systemen wird immer ein Ligand zur Stabilisierung des Cu(I) gegenüber der biologischen Probe verwendet^[8, 91, 85]. Der hier verwendete Ligand zur Stabilisierung des Kupfers in späteren biochemischen Systemen wurde gewählt, weil er sich schon in biochemischen Fragestellungen, die mit Hilfe

3 Ergebnisse

der Click Reaktion beantwortet wurde, bewährt hatte und darüber hinaus eine hervorragende Wasserlöslichkeit ausweist^[87, 92]. Ähnliche Liganden eignen sich zwar ebenso gut für eine erfolgreiche Stabilisierung und werden auch bei biochemischen Fragestellungen teilweise eingesetzt^[6], weisen jedoch nicht eine annähernd so gute Wasserlöslichkeit auf, was die Verwendung von teilweise über 50 % *tert*-Butanol als Lösemittel notwendig macht^[88]. Bevor der Ligand in komplexen Systemen eingesetzt werden soll, wurde untersucht inwieweit die Reaktion möglicherweise nur durch den Liganden selbst beeinflusst wird.

Tabelle 12: Click-Bedingungen - Ligand

Eintrag	Kupfer [Äquiv.]	TPTA [Äquiv.]	Umsatz [%]
1	0.1	0.2	48 ^a
2	0.1	0.1	60
3	0.1	0.05	72
4	0.1	0.1	75
5	0.2	0.2	88
6	0.3	0.3	93

33 μM **138**, 66 μM **139**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Raumtemperatur, Reaktionszeit: 60min,

^a Durchschnittswert von mehreren Versuchen

Bei der Untersuchung des Einflusses des Liganden zeigte es sich, dass der Ligand die Reaktion hemmt. Die erzielten Umsätze waren mit ca. 40 – 70 % deutlich geringer (Tabelle 12, Einträge 1 – 3) als ohne Ligand. Bei nachfolgenden Experimenten, wurde ein Molverhältnis von Kupfer und Ligand von 1:1 verwendet. Dabei wobei bei einer leicht erhöhten Kupferkonzentration von 0.3 Äquiv. 93 % Umsatz erzielt werden (Tabelle 12, Eintrag 6). Wie in Tabelle 10 beschrieben, ist eine Kupferkonzentration von 10 mol% ausreichend für eine erfolgreiche Click-Reaktion, solange kein Ligand mit hinzugesetzt wird (Tabelle 12). Diese Konzentration wurde in weiteren Versuchen so belassen. Des Weiteren wurden die folgenden Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde die Anwendbarkeit verschiedener Puffersysteme, wie auch weiterer Reagenzien untersucht, die für eine biochemische Handhabung von Proteinen unerlässlich sind:

- Puffer: HEPES, PBS, Capture Puffer 1 (CP 1), Tris, ECOB
- Pufferbestandteile und weitere Zusätze: EDTA, KOAc, $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, Glycerin, β -Mercaptoethanol

EDTA ist ein bekannter Komplexbildner und verhindert in stöchiometrischen Mengen die Click-Reaktion (Tabelle 13, Eintrag 1). In den in der Abteilung Biochemie verwendeten Puffern ist EDTA jedoch nur in geringeren Mengen vorhanden. Diese behindern die Reaktion

3 Ergebnisse

nicht (Tabelle 13, Eintrag 2) und es wurde annähernd quantitativer Umsatz erreicht. Auch HEPES (16.5 mM) und PBS-Puffer (132 mM NaCl, 132 mM K₂HPO₄, 132 mM KH₂PO₄) beeinflussen die Reaktion nicht. Es wurde in beiden Fällen Umsätze von über 90 % erzielt (Tabelle 13, Einträge 3 u. 4). Bei der Verwendung von Capture Puffer 1 (132 mM HEPES, 330 mM KOAc, 66 mM Mg(OAc)₂, 10% Glycerin) konnte das Produkt nur in Spuren beobachtet werden (Tabelle 13, Eintrag 5).

Tabelle 13: Click-Bedingungen - biochemische Zusätze

Eintrag	Zusätze [Äquiv.]	t [min]	Umsatz [%]
1	EDTA (0.1)	60	0
2	EDTA (0.05)	60	98
3	HEPES	80	99
4	PBS	80	93
5	CP 1	80	1, 8 ^a
6	Glycerin (10%)	30	100
7	KOAc (0.25m) + Mg(OAc) ₂ (0.05m)	30	30, 21 ^a
8	ECOB	60	0, 0 ^a
9	Tris	60	1, 1 ^a
10	β-Mercaptoethanol (0.002)	30	99, 80 ^a
11	β-Mercaptoethanol (0.05)	30	95, 45 ^a
12	β-Mercaptoethanol (0.1)	30	85 ^b
13	β-Mercaptoethanol (0.2)	30	23

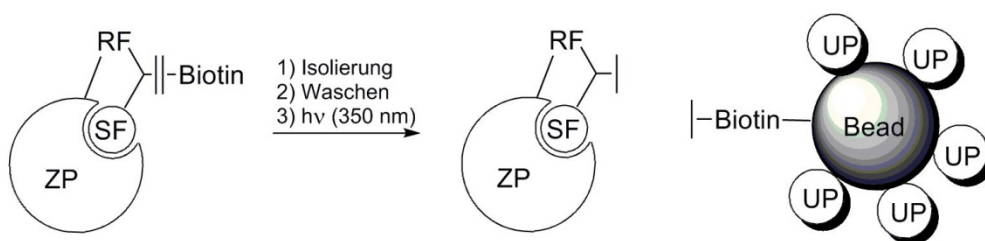
33 μM **138**, 66 μM **139**, 0.1 Äquiv. CuSO₄ · 5H₂O, 3.0 Äquiv. Natriumascorbat, Raumtemperatur, ^a + 0.1 Äquiv. Ligand, ^b Durchschnittswert von mehreren Versuchen

Der Umsatz konnte durch die Verwendung es TPTA-Liganden nicht signifikant gesteigert werden. Bei der Untersuchung der einzelnen Pufferbestandteile hat sich gezeigt, dass Glycerin keinen Einfluss hat (Tabelle 13, Eintrag 6) und dass Acetate den Umsatz verringern (Tabelle 13, Eintrag 7). Ebenso verhindern die Puffer ECOB (0.7 mM β-Mercaptoethanol, 0.7 mM HEPES, 0.7 mM NaOAc, 1.0 mM EDTA, 200 mM NaCl) und Tris (25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1.0 mM MgCl₂, pH = 7.4) eine erfolgreiche Click-Reaktion (Tabelle 13, Einträge 8 u. 9). Die Verwendung des Liganden kann nicht zur Steigerung des Umsatzes beitragen. β-Mercaptoethanol stört die Reaktion in geringen Mengen nicht (Tabelle 13, Einträge 10 u. 11). Ein signifikanter Einfluss bei einem Molverhältnis von Kupfer und β-Mercaptoethanol von 1:1 wurde ebenfalls nicht beobachtet (Tabelle 13, Eintrag 12). Nur in Gegenwart des Liganden oder im Überschuss (bezogen auf die eingesetzte Kupferkonzentration) wurde ein deutlich geringerer Umsatz festgestellt (Tabelle 13, Eintrag 13). Es wurden essentielle Parameter für eine erfolgreiche Click-Reaktion zwischen einem Azid und einem Alkin erarbeitet. Diese beinhalten bisher nicht beschriebene Abhängigkeiten

der Click-Reaktion von Schütteln der Lösung bis zur Temperatur und Puffer, die sich als Lösungsmittel für eine erfolgreiche Click-Reaktion eignen. Alle durchgeführten Versuche wurden ausschließlich in wässrigen Lösungen, ohne organische Lösmittel, durchgeführt. Basierend auf diesen Ergebnissen findet zurzeit eine weitere Evaluierung der Anwendungsmöglichkeiten in der Abteilung Biochemie statt.

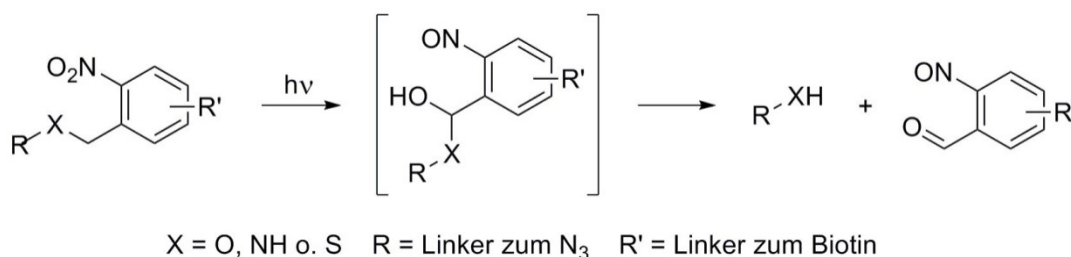
3.6.3 Neuer photospaltbarer Azid-Biotin-Linker

Wie schon in Kapitel 1.6 erläutert, sollten die spezifischen Proteine nach erfolgter Isolierung selektiv von den Beads abgespalten werden (Schema 55).



Schema 55: Photolytische Spaltung des Scaffolds nach erfolgtem Capturen

Eine Möglichkeit bieten *o*-Nitrobenzyllderivate, die ein zentrales Strukturelement im Azid-Linker darstellen würden. Solche Strukturen sind unter Bestrahlung durch UV-Licht instabil, was zu einer Spaltung der Verbindung führt (Schema 56)^[59, 93], ohne den Zusatz von weiteren Reagenzien.

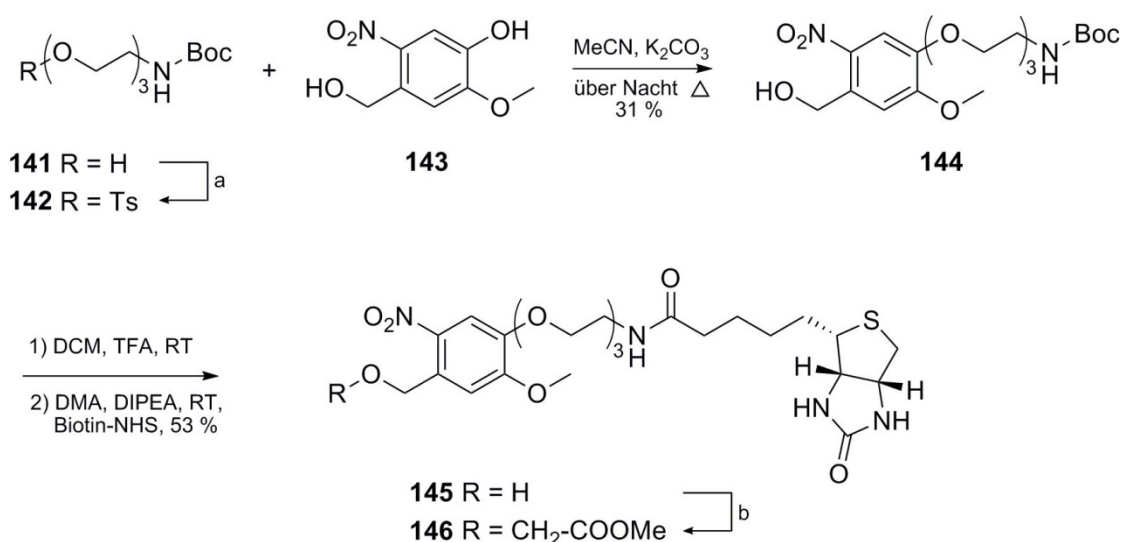


Schema 56: UV-lichtinduzierte Spaltung von *o*-Nitrobenzyllderivate

Die dafür benötigte Wellenlänge ist mit 350 nm^[93, 59] identisch mit der Anregungswellenlänge von Diazirinen. Dadurch ist die längerwellige caproBox ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) doppelt nutzbar. Durch UV-Bestrahlung bei 350 nm kommt es zu einer intramolekularen Oxidationsreaktion des Benzylethers durch die *o*-ständige Nitrogruppe. Dies führt zur Bildung einer instabilen Zwischenstufe, die anschließend zum Benzaldehyd und freiem (Thio)alkohol bzw. Amin zerfällt (Schema 56).

3 Ergebnisse

Die Synthese des photospaltbaren Azid-Linkers ging von dem Benzylalkohol **143** aus, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Hackenberger^[94] zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurde nach Tosylierung des Alkohols **141**^[95] dieser mit der phenolischen OH-Funktion des Benzylalkohols **143** zum Phenolether **144** umgesetzt (Schema 57). Obwohl LC-MS-Daten einem Umsatz von deutlich über 50 % anzeigten, konnten nur 31 % nach Chromatographie isoliert werden.



Schema 57: Darstellung eines photospaltbaren Azid-Linkers - Teil 1

a: DCM, DMAP, TEA, TsCl, RT, 7 h, 93 %,

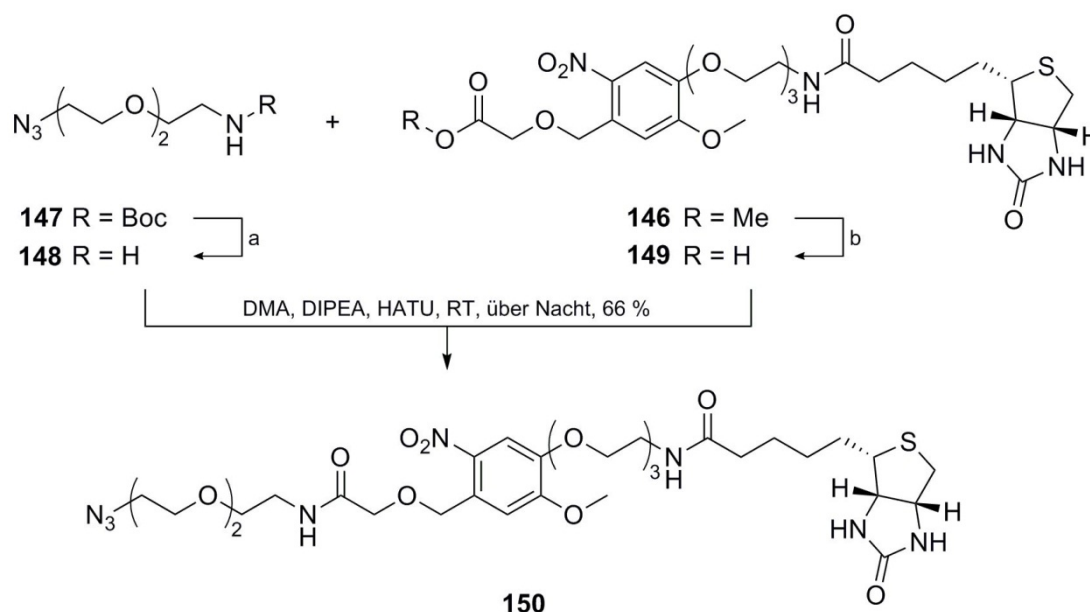
b: DMF, NaH, Brommethylacetat, RT, Lichtausschluss, 1 d, 33%

Anschließend erfolgte die Entschützung des erhaltenen Substrates **144**, gefolgt von der Einführung des Biotins als NHS-Ester (Schema 57). Durch die sich anschließende Umsetzung mit Brommethylacetat wurde ein Baustein eingefügt, der es nach Spaltung des Methylesters gestattet, Azide mit beliebiger Kettenlänge, je nach Problemstellung, einzuführen. Jedoch gelang die Alkylierung des Benzylalkohols **145** nur mit 33 %.

Typischerweise gelingen Alkylierungen von Benzylalkoholen ähnlicher Struktur mit Brommethylacetat in annähernd quantitativen Ausbeuten^[96]. Dafür ist jedoch ein mehrtägiges starkes Erwärmen auf bis zu 68 °C nötig, was bei **145** bereits nach 1 h zu einer intramolekularen Oxidationsreaktion führte. Die Verwendung von Kronenethern^[97] führte ebenfalls zu unkontrollierten Nebenreaktionen. Die besten Ergebnisse wurden unter den oben genannten Reaktionsbedingungen (Schema 57, b) erzielt. Bei Raumtemperatur kam es nicht zu der oxidationsbedingten Nebenreaktion und ebenfalls auftretende weitere Nebenreaktionen waren stark verlangsamt. Teilweise konnte nicht umgesetztes Edukt **145** wieder gewonnen werden. Für die Einführung des azidtragendes Linkers **147**^[98, 99] erfolgte die Freisetzung des Amins **148** mit TFA (Schema 58, a) und die Verseifung des Methylesters **146** mit LiOH

3 Ergebnisse

(Schema 58, b). Die anschließende HATU vermittelte Amidbindung verlief unter Standardbedingungen (Schema 58) bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Tages- und Laborlicht. Da die Auswaage des Produktes **150** unter 10 mg lag, wurde zur eindeutigen Bestimmung der Ausbeute ein HABA-Avidin-Assay durchgeführt. Somit konnte auch die Konzentrationen der wässrigen Lösungen für die folgenden Spaltungsuntersuchungen exakter als über eine Auswaage eingestellt werden.



Schema 58: Darstellung eines photospaltbaren Azid-Linkers - Teil 2

a: DCM, TFA, quant; b: THF/Wasser, LiOH, quant

In einem ersten Versuch wurden die Proben unter Standardbedingungen ($1 - 4^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{max}} = 350\text{ nm}$) für $1 - 20\text{ min}$ bestrahlt. Nach 2 min wurde annähernd vollständiger Umsatz festgestellt und es konnten keine Folgereaktionen der Photolyseprodukte beobachtet werden.

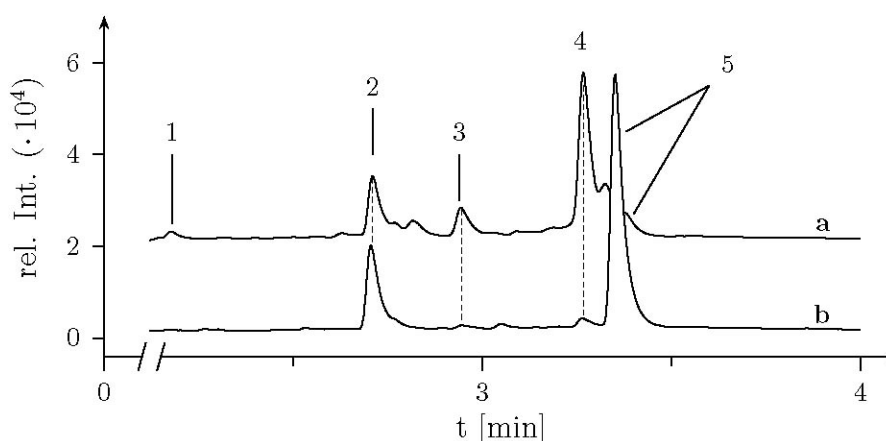


Abbildung 43: UV-Chromatogramm (254 nm) der Photolyseprodukte

a nach 2 min Bestrahlung mit $\lambda_{\text{max}} = 350\text{ nm}$, rel. Int. + 1000

b nach 4 h Bestrahlung mit Raumlicht, 1–5 siehe Tabelle 14

3 Ergebnisse

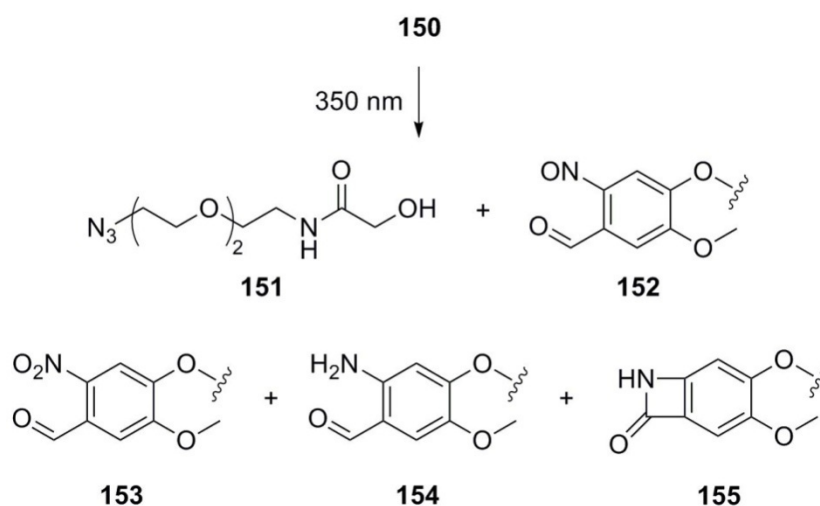
Daraufhin wurden die Zeitintervalle deutlich verkürzt und die erste Probe nach 2 s Bestrahlung analysiert. Bereits innerhalb dieses kurzen Zeitintervalls konnte ein geringer Anteil an Photolyse festgestellt werden. Aufgrund dieser hohen Empfindlichkeit von **150** gegenüber UV-Licht ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) war es von großem Interesse, die Empfindlichkeit gegenüber normalem Laborlicht zu untersuchen. Dafür wurden die Proben auf der Laborbank für 4 h dem Laborlicht ausgesetzt. Die erhaltenen UV-Chromatogramme bei 254 nm der HPLC-MS-Analysen von 2 min Bestrahlung mit $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ und 4 h Bestrahlung mit Laborlicht sind in Abbildung 43 dargestellt.

Tabelle 14: Detektierte Spaltungsprodukte

Peak Nr.	Retenzionszeit [min]	Masse [M-H] ⁺ [m/z]	Verbindung Nr.
1	2.18	525.3	154
2	2.71	539.3	152
3	2.94	523.3	155
4	3.26	555.3	153
5	3.38	771.4	150

c = 50 μM , T = 1 – 4 °C, Bestrahlzeit: 2 min, Photolyse erfolgte bei $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$

Eine Zuordnung der einzelnen Peaks zu postulierten Photolyseprodukten (Schema 59) ist in Tabelle 14 vorgenommen worden.

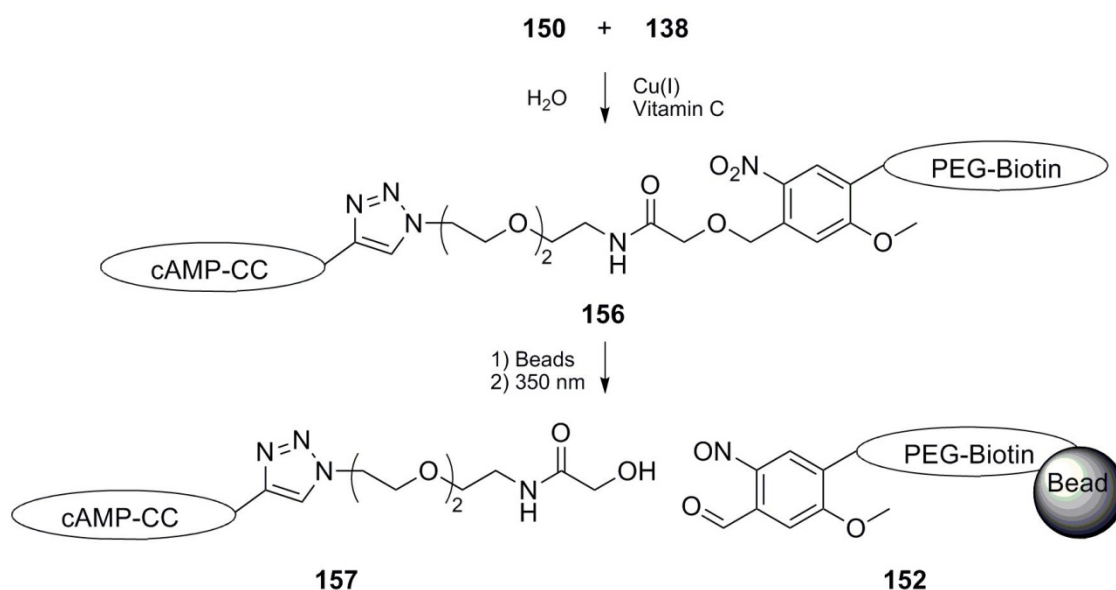


Schema 59: Postulierte Photolyseprodukte des photospaltbaren Linkers bei 350 nm

Die gefundenen Peaks ließen sich teilweise den nach Schema 56 erwarteten Produkten zuordnen. Besonders die Produkte Nr. 2 und 4 sind als primäres Photolyseprodukt **152** und dessen Oxidationsprodukt **153** erwartet worden. Obwohl er durch fehlende UV-Absorption nicht dargestellt wurde, wurde der primäre Alkohol **151** mit intaktem Azid im Massenspektrum nachgewiesen. Die getroffene Zuordnung zu den Produkten Nr. 1 und 3 ist

allein auf die erhaltenen Massen gestützt. Die Struktur dieser Produkte **154** und **155** ist durch den teilweise radikalischen Verlauf der Photolyse^[59] denkbar.

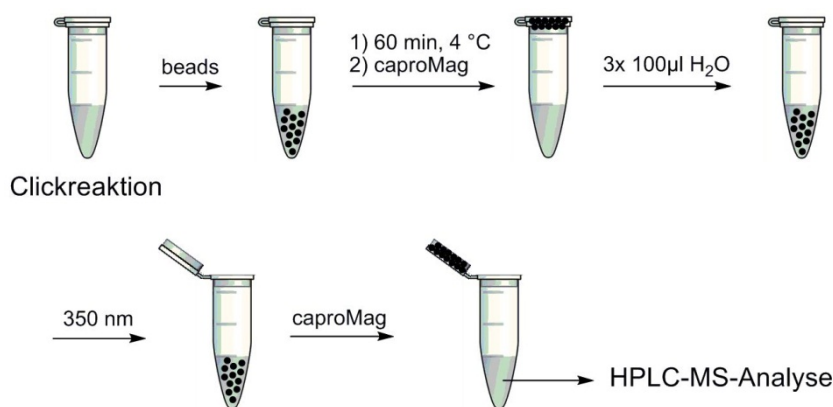
Für eine effektive Anwendung dieses Click & Cleave Konzeptes in einem biochemischen Experiment ist es notwendig, dass die Photolyse nach erfolgter Click-Reaktion zur Isolierung des Proteins und anschließenden Waschschritten ebenso an der festen Phase (Beads) durchzuführen ist. Dazu wurde in einer ersten Machbarkeitsstudie in Anlehnung an die gefunden optimalen Click-Bedingungen, die Click-Reaktion mit der clickfähigen Capture-Compound **138** und dem synthetisierten photospaltbaren Linker **150** durchgeführt (Schema 60). Um das Click-Produkt zu isolieren, wurde nach erfolgter Reaktion 100 µl der Reaktionslösung für 60 min mit Streptavidin beschichteten Magnetbeads bei 4 °C inkubiert.



Schema 60: Click & Cleave Konzept - chemischer Hintergrund

Anschließend erfolgte die Isolierung der Beads mittels caproMag, gefolgt von Waschschritten, um alle nicht biotinylierten Substanzen zu entfernen. In den Überständen nach der Isolierung und nach den jeweiligen Waschschritten konnte kein Reaktionsprodukt **156** nachgewiesen werden. Die gewaschenen Magnetbeads wurden erneut in Wasser resuspendiert und für 10 min in der caproBox bei ($\lambda_{max} = 350\text{ nm}$) bestrahlt. Alle 2min wurden die Beads resuspendiert um eine möglichst optimale Durchmischung zu erreichen. Durch das Belichten der Beads kam es zu der in Schema 60 vorgestellten Spaltungsreaktion des Clickproduktes **156**, wobei primär der Benzaldehyd **152** und der Alkohol **157** entstanden. Da der Benzaldehyd **152** über das Biotin mit den Beads verbunden blieb, konnte nur die abgespaltete Capture Compound + Linker (**157**) im Überstand massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 44).

3 Ergebnisse



Schema 61: Click & Cleave Konzept - praktische Durchführung

Obwohl noch Optimierungsschritte notwendig sind um die detektierten und ohne Strukturaufklärung nicht identifizierbaren Nebenprodukte (Abbildung 44) zu vermeiden, wurde erfolgreich die photochemische Abspaltung eines Clickproduktes von den Beads gezeigt. Dies ermöglicht die Entwicklung eines Pullout-Systems, dass durch die photochemische Abspaltung des Proteins nach erfolgter Isolierung den Hintergrund drastisch verringern würde.

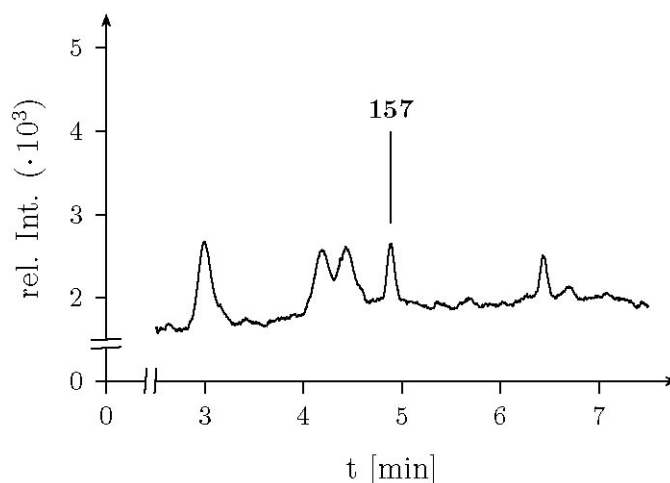
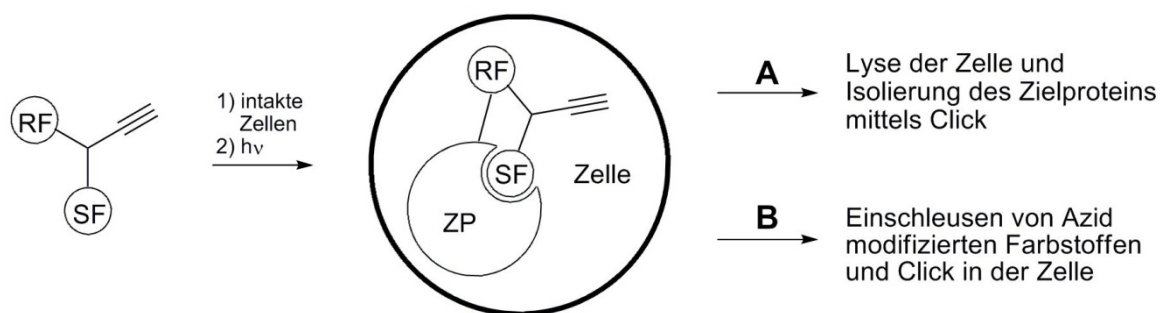


Abbildung 44: Nachweis des Photolyseproduktes mittels HPLC-MS
(UV-Chromatogramm bei 254 nm)

Obwohl noch Optimierungsschritte notwendig sind um die detektierten und ohne Strukturaufklärung nicht identifizierbaren Nebenprodukte (Abbildung 44) zu vermeiden, wurde erfolgreich die photochemische Abspaltung eines Clickproduktes von den Beads gezeigt. Dies ermöglicht die Entwicklung eines Pullout-Systems, dass durch die photochemische Abspaltung des Proteins nach erfolgter Isolierung den Hintergrund drastisch verringern würde.

3.6.4 Synthese von zellgängigen Scaffolds und Capture Compounds

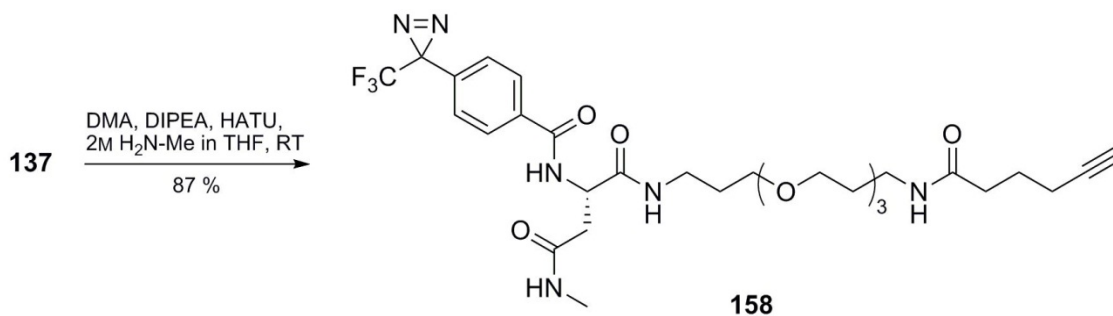
Die CCMS-Technologie erlaubt es bisher nicht, gezielt in intakten, ggf. noch lebenden Zellen arbeiten zu können, da die genutzten CCs aufgrund ihrer Größe nicht zellgängig sind. Schema 62 zeigt zwei mögliche Experimente, die mit sehr kleinen zellgängigen CCs durchgeführt werden könnten. In beiden Fällen würde die spezifische Wechselwirkung zwischen Selektivitätsfunktion (SF) und Zielprotein (ZP) und photoinduzierter kovalenter Crosslink innerhalb einer intakten Zelle stattfinden.



Schema 62: Potentielle Anwendungen von zellgängigen Capture Compounds

Die Zellmembran könnte anschließend zerstört und das Zielprotein mittels Click-Chemie isoliert und analysiert werden (A). Durch Zusetzen von clickfähigen und zellgängigen Fluorophoren, wäre eine Fluoreszenzmarkierung des Zielproteins möglich. Dadurch könnten Kenntnisse von bisher in ihrer Funktion unbekannten Proteinen in zellulären Prozessen gewonnen werden.

Das als Medikament genutzte Vorinostat (SAHA) ist zellgängig^[100] und eignet sich aufgrund dessen und seiner pharmakologischen Bedeutung^[31, 32] als Selektivitätsfunktion. Um den Einfluss des bisherigen großen Scaffolds auf die Zellgängigkeit von vollständigen CCs zu untersuchen, wurde das Scaffold-Amid **137** synthetisiert (Schema 63).

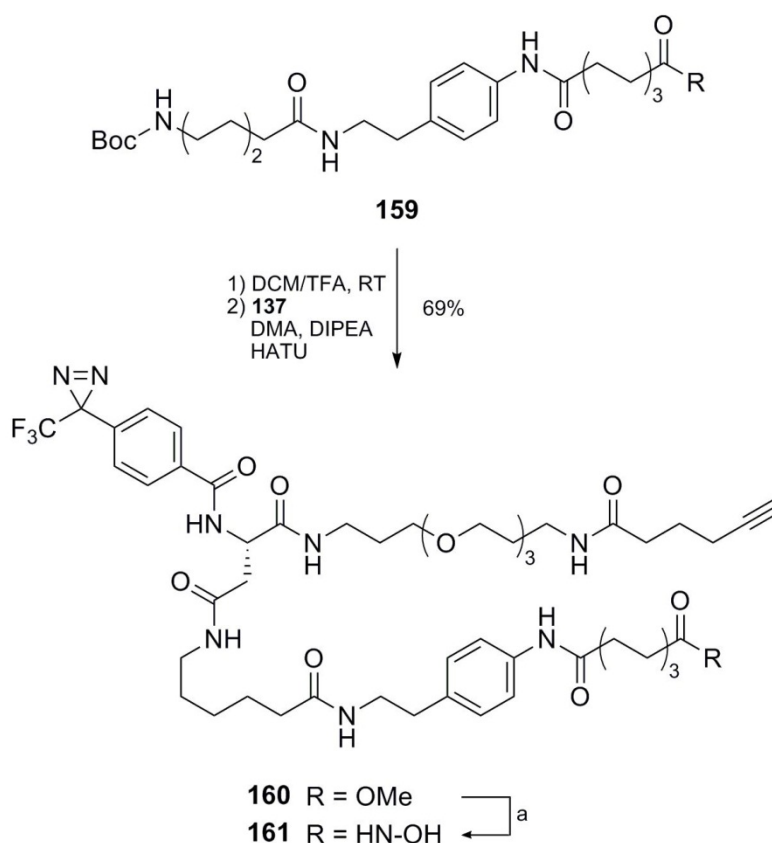


Schema 63: Darstellung eines Click-Scaffold-Amides

3 Ergebnisse

Durch das Amid liegt, ebenso wie in den CCs, keine freie Carbonsäure mehr vor. Diese könnte die Zellgängigkeit stark beeinflussen, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Die Alkin-Funktion gestattet die Isolierung durch eine Kupfer(I)-katalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition.

Der Aufbau einer SAHA-enthaltenen Capture Compound erfolgte in drei Schritten. Dazu wurde nach erfolgter Boc-Spaltung des linkertragenden SAHAs **159** (von der Abteilung Medizinische Chemie zur Verfügung gestellt) die HATU vermittelte Amidbindung in einer Gesamtausbeute von annähernd 70 % geknüpft.

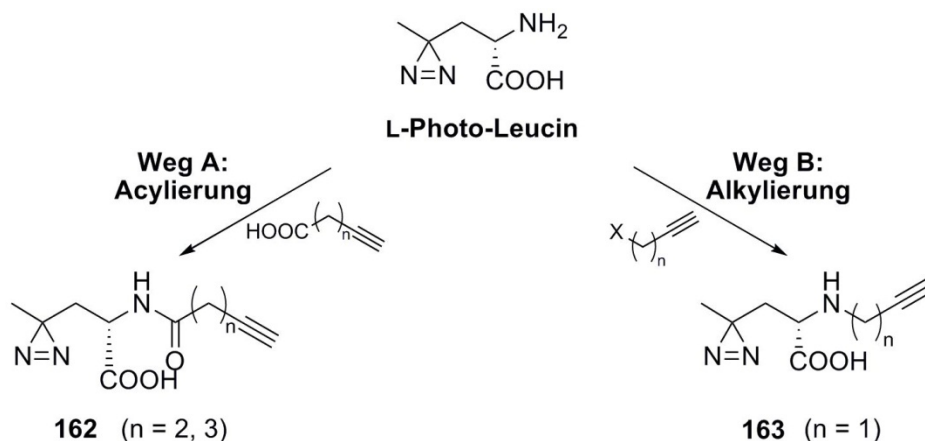


Schema 64: Darstellung einer SAHA-Click-CC

a: 1) THF/Wasser, LiOH; 2)DMA,
DIPEA, Ethylchlorformiat, Hydroxylaminhydrochlorid, 100%

Nach anschließender Verseifung von **160** wurde das Hydroxylamid **161** durch eine Ethylchlorformiat vermittelte Aktivierung der freien Carbonsäure mit ungeschützten Hydroxylamin aufgebaut. Es wurde kein vollständiger Umsatz erzielt, jedoch konnte die nicht umgesetzte freie Säure während der Aufreinigung wiedergewonnen werden. Darauf bezogen wurde eine quantitative Ausbeute an **161** erreicht (Schema 64). Neben der synthetisierten SAHA-Compound **161**, die auf Basis des herkömmlichen Scaffolds mit Alkin anstelle des Biotins konzeptionierte wurde, wurde auch gezielt an der Synthese von sehr kleinen CCs und

deren Scaffolds gearbeitet, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in intakte Zellen eindringen können. Dass sich aliphatische Diazirine als Reaktivitätsfunktion eignen, ist schon am Beispiel der beiden Photo-Aminosäuren L-Photo-Leucin und L-Photo-Methionin gezeigt worden. Wie bereits in Kapitel 2.5 gezeigt, sind diese Aminosäuren von sich aus trifunktional, mit einem photoaktivierbaren Diazirin, wodurch sie die ideale Grundstruktur für sehr kleine Scaffolds sind. Da anstelle des Biotins nur eine endständige Alkin-Funktion für eine erfolgreiche Isolierung notwendig ist, sollten die daraus synthetisierten Capture Compounds aufgrund ihrer geringen Größe mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine erhöhte Zellgängigkeit aufweisen. Da L-Photo-Leucin um eine CH₂-Gruppe leichter und kleiner als L-Photo-Methionin ist, wurde nur mit dem L-Photo-Leucin in den folgenden Experimenten gearbeitet. Für die Einführung einer Alkin-Funktion wurden zwei mögliche Wege untersucht (Schema 65).

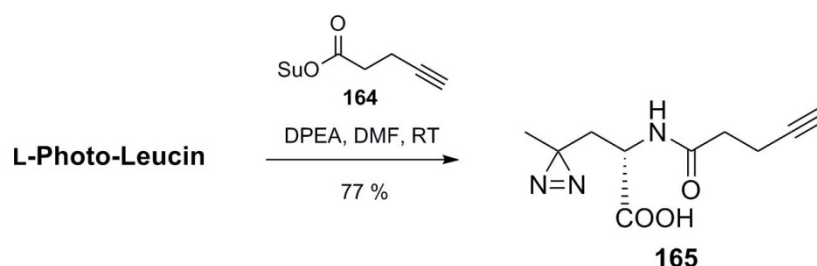


Schema 65: Untersuchte Reaktionswege für die Einführung einer Alkin-Funktion

Weg A liefert in einem Schritt über eine NHS-aktivierte Carbonsäure für die Acylierung das vollständige Scaffold. Dieses ist jedoch durch die Carboxylgruppe und eine Mindestkettenlänge von min. n = 2 für ein stabiles Molekül etwas größer als das über den Weg B zugängliche Scaffold. In diesen Fall ist über eine nukleophile Substitution die Synthese eines kleineren Scaffolds (n = 1) möglich. Jedoch wurde eine zusätzliche Schutzgruppenoperation (Veresterung der freien Säure) notwendig. Im Folgenden wurden beide Wege untersucht und aus den erhaltenen Scaffolds Capture Compounds dargestellt, die auf ihre Zellgängigkeit hin getestet werden sollten.

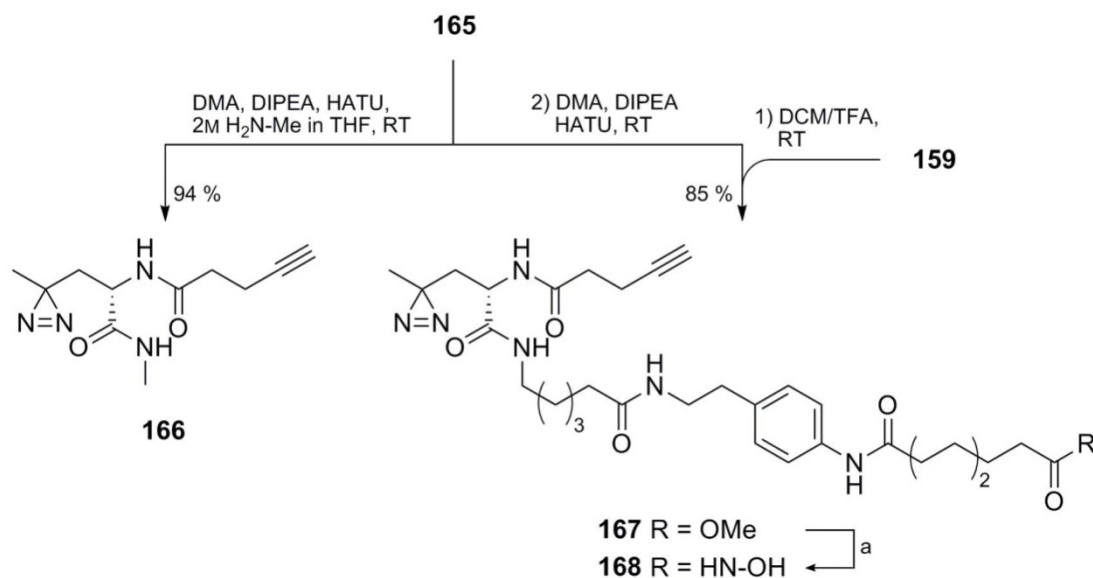
Scaffold- und CC-Synthese: Weg A

Bei der Darstellung eines sehr kleinen, für das Click bzw. Click & Cleave Konzept geeigneten Scaffolds mittels Acylierung mit der NHS-aktivierten Carbonsäure **164** wurde vom ungeschützten L-Photo-Leucin ausgegangen. Dies hat neben einer schnellen Synthese noch den Vorteil, dass das erhaltene Produkt ohne Schutzgruppen verwendet werden kann. Dazu wurde der NHS-Ester **164**^[101] mit L-Photo-Leucin in DMF umgesetzt. Das erhaltene „Mini“-Scaffold konnte nach chromatographischer Reinigung in 77 % Ausbeuten erhalten werden (Schema 66).



Schema 66: Darstellung eines „Mini“-Scaffolds mittels Acylierung

Aus **165** wurde zum einen das Scaffold-Amid **166** und zum anderen die CC **168** dargestellt, um den Einfluss des Scaffolds untersuchen zu können.



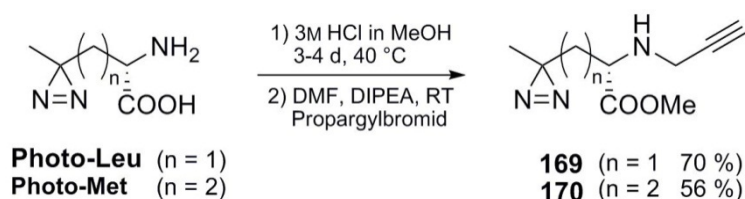
Schema 67: Darstellung eines „Mini“-Scaffold-Amides samt „Mini“-SAHA-CC

a: 1) Wasser/THF, LiOH, RT, quant.; 2) DMA, DIPEA, Ethylchlorformiat, H₂N-OH, RT, 75%

Die Synthese des Scaffold-Amides **166** und der CC **168** erfolgte in schon geschilderter Weise in beiden Fällen in guten bis sehr guten Ausbeuten (Schema 67).

Scaffold- und CC-Synthese: Weg B

Für eine erfolgreiche Alkylierung des Stickstoffes war zunächst die Veresterung der freien Säure notwendig. Dazu wurde L-Photo-Leucin in 3M HCl in Methanol bei leichter Erwärmung für mehrere Tage gerührt (Schema 68).



Schema 68: Veresterung & Alkylierung von L-Photo-Leucin bzw. -Methionin

Die Überprüfung des Umsatzes war aufgrund der geringen Masse und unzureichender Ionisation nicht mit HPLC-MS möglich. Am effektivsten und genauesten konnte der Umsatz anhand von NMR-Spektren bestimmt werden.

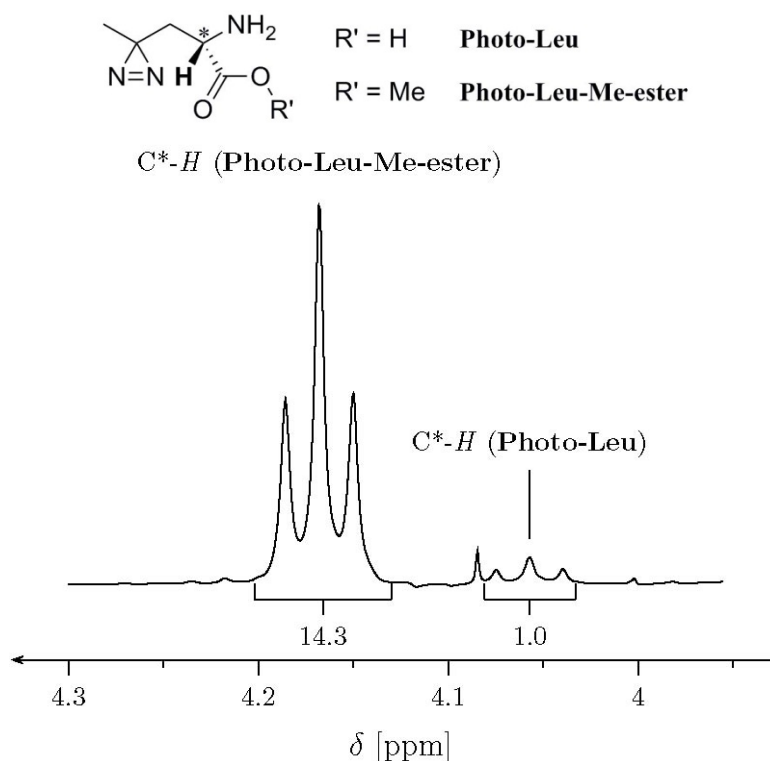
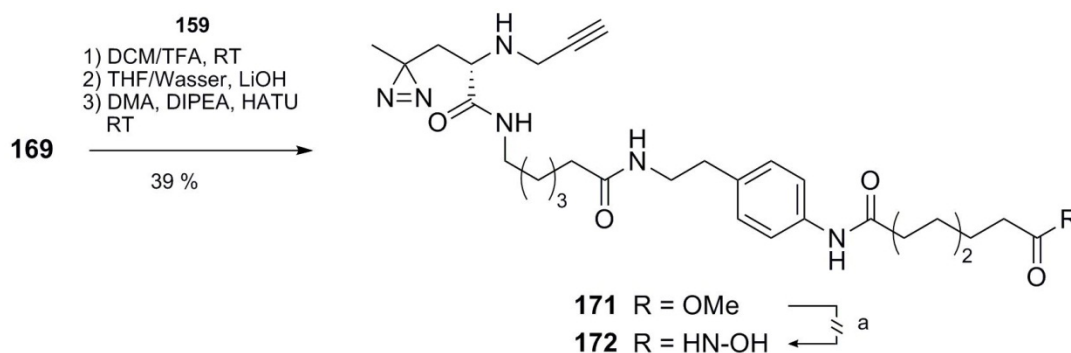


Abbildung 45: NMR-Spektrum zur Reaktionskontrolle der Veresterung

Dazu wurden, wie in Abbildung 45 zu sehen ist, das Verhältnis der Integrale des Wasserstoffes am Stereozentrum von Edukt und Produkt gebildet (hier: 93% Umsatz). Der Umsatz konnte auch durch Einengen und erneutes Aufnehmen in frischer 3M HCl in Methanol und leichtem Erwärmen nicht auf 100 % erhöht werden. Eine Aufreinigung des erhaltenen Esters wurde nicht vorgenommen, es erfolgte eine sofortige Umsetzung mit

Propargylbromid (Schema 68). Über die zwei Stufen gelang die Darstellung der geschützten Scaffolds **169** und **170** in Ausbeuten von 70 bzw. 56 %. Die Umsetzung der Säuren zu den jeweiligen Methylestern gelang fast quantitativ. Während der anschließenden Alkylierung kam es zu einer Doppelalkylierung des Stickstoffes. Durch vorsichtiges Dosieren des Propargylbromides bei Raumtemperatur, konnte diese Nebenreaktion teilweise verringert werden. Eine Abtrennung des Nebenproduktes war säulenchromatographisch möglich. Für die anschließende Synthese einer vollständigen Capture Compound mit SAHA als Selektivitätsfunktion wurde nur mit dem Photo-Leucin Scaffold **169** weitergearbeitet.

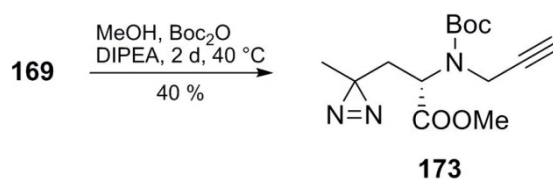
Die Darstellung einer kleineren SAHA Capture Compound **172** als **168** sollte auf demselben Weg wie bereits in Schema 67 beschrieben erfolgen. Obwohl mit geringer Ausbeute, gelang die erste Stufe zur Methylester geschützten Capture Compound **171** auch analog zu den vorherigen Synthesen (Schema 69).



Schema 69: Darstellung einer „Mini“-SAHA-CC

a: 1) Wasser/THF, LiOH, RT, quant.; 2) DMA, DIPEA, Ethylchlorformiat, H₂N-OH, RT, keine Produktbildung zubeobachten!

Nach der Freisetzung der Carbonsäure kam es während der Umsetzung mit der als gemischtes Anhydrid aktivierten Carbonsäure zu Nebenreaktionen. Wahrscheinlich wirkt sich das im Scaffold vorhandene sekundäre Amin störend aus und reagiert ebenfalls mit dem Ethylchlorformiat, wahrscheinlich in einer S_N-Reaktion. Eine Bildung des gewünschten Produktes konnte nicht beobachtet werden.



Schema 70: Boc-Schützung des Photo-Leucin-Scaffoldes

Somit wäre für folgende Experimente die Verwendung eines geschützten Amins unerlässlich. Dazu wurde das Photo-Leucin Scaffold **169** mit Bocanhydrid umgesetzt. Trotz einer zweitägigen Reaktionszeit und leichtem Erwärmen, gelang dies nur zu 40 % an isoliertem Produkt (Schema 70). Da sich die Synthese der kleineren Capture Compound **172** durch die oben geschilderten Probleme und daraus resultierenden weiteren Schutzgruppenoperationen stark verzögerte, wurden die bereits synthetisierten Verbindungen **158**, **161**, **166** und **168** zur Untersuchung der Zellgängigkeit an CaCO₃-Zellen der Arbeitsgruppe Frieker, Uni Heidelberg übergeben. Es wurde daraufhin mit der Synthese der Capture Compound **172** gewartet, bis aussagekräftige Ergebnisse der vorherigen Verbindungen vorliegen. Die Bestimmung der Zellgängigkeit, insbesondere die nachfolgende Analyse stellte sich als schwieriger als zuerst gedacht heraus und dauert weiter an.

3.6.5 Zusammenfassung

Durch die Etablierung der Click-Chemie im Rahmen der CCMS-Technologie wurden neuartige CCs entwickelt und synthetisiert, die es erlauben sollten, die CCMS-Technologie auch in intakten Zellen anzuwenden. Eine erfolgreiche Anwendung von zellgängigen CCs würde das Anwendungsspektrum der CCMS-Technologie stark erweitern. Des Weiteren wurde mit dem neuartigen Click & Cleave Konzept eine Möglichkeit aufgezeigt, mit der der unspezifische Hintergrund auf ein Minimum reduziert werden kann. Beide Anwendungsgebiete werden weiter in der Abteilung Biochemie bearbeitet.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Geräte, Arbeitstechniken und Reagenzien

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Alfa Aesar, Aldrich, Applichem, Armar Chemicals, Bachem, Chemsolute, Fischer Scientific, Fluka, Merck, Roth und VWR erworben.

Dünnschichtchromatographie wurde mit Fertigplatten *Kieselgel 60* der Firma Merck (Typ 60-F254) durchgeführt. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte nach der Detektion bei 254 nm je nach Verbindungstyp durch Eintauchen in einer Lösung aus 4.0 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10. g $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10}) \cdot \text{H}_2\text{O}]$, 24 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc.})}$ und 376 ml H_2O oder in einer Lösung aus 0.3 g Ninhydrin, 100 ml BuOH und 3 ml AcOH oder in einer Lösung aus 4 g KMnO_4 , 26 g K_2CO_3 , 6.5 ml 5 % NaOH und 400 ml Wasser und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftgebläse.

Exakte Massen wurden an einer *Orbitrap LTQ XL* von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Fragmentierung erfolgte mittels Collision induced dissociation (CDI) und die Kollisionsenergie betrug 10 – 35 eV. Die angegebenen Werte für die exakte Masse besitzen eine Maximalabweichung von ± 3 ppm.

Flashchromatographie wurde an Geduran Si 60 Kieselgel der Firma Merck (Korngröße: 40-63 μm) bei Raumtemperatur mit einem N_2 -Überdruck von 0.4 – 1.4 bar durchgeführt.

Gelelektrophoresen wurden in einer *OLS omniPAGE mini Gelelektrophoresekammer* der Firma OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG mit *ProGel 4 – 20 % Tris/Glycin-Gele* (1.0 mm, 15 Bahnen) von anamed Elektrophorese GmbH durchgeführt.

High Performance Liquid Chromatographie - Massenspektrometrie (HPLCMS) zur Reaktions- und Stabilitätskontrolle wurden mit einem automatischen Probenmanagment System *HTC* von PAL einer Waters *1525* binären HPLC Pumpe, einem Waters *2998*

Photodiode Array Detektor und einem Waters *micromass LCT* – Spektrometer durchgeführt. Es wurde im Positivionenmodus in einem Bereich von 100 – 3000 g/mol gemessen. Als Lösemittel wurden A (Wasser + 0.1 % HCOOH) und B (MeCN) verwendet. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden gearbeitet: **Screening:** Säule: *Cartdrige Synergi Fusion RP* von Phenomenix, 20 x 2 mm, Kieselgel: C18 mit 100 Å Porengröße und 2.5 µm Teilchendurchmesser, Gradient: Fluss 0.4 ml/min, 0 → 9min (90 %A/10 %B auf 60 %A/40 %B), 9 → 11min (60 %A/40 %B auf 100 %B), 11 → 15min (100%B); **Kinetex:** Säule: *Kinetex* von Phenomenix, 50 x 3 mm, Kieselgel: C18 mit 100 Å Porengröße und 2.6 µm Durchmesser, Gradient: Fluss 0.8 ml/min, 0 → 2min (90 %A/10 %B auf 60 %A/40 %B), 2 → 3.5min (60 %A/40 %B auf 100 %B), 3.5 → 5min (100 %B). Die Methode und die Retentionszeiten sind folgendermaßen im experimentellen Teil dargestellt: z.B. Methode: Kinetex, Produkt: 2.65 min.

¹H- und **¹³C-NMR-Spektren** wurden mit einem Bruker *400 UltraShield*-Spektrometer aufgenommen. Die Frequenz lag bei ¹H-NMR-Messungen bei 400 MHz und bei ¹³C-NMR-Messungen bei 100 MHz. Die Kalibrierung erfolgte nach den Lösemittelrestsignalen und die chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten [ppm] angegeben. Die Multiplizitäten werden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), quint (Quintett) bezeichnet (br. = breit). Als Lösemittel wurden CDCl₃-d₁, MeOD-d₄, DMSO-d₆ und MeCN-d₃ verwendet. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben.

Kapazitätsbestimmung der Anti fluorescein-Antikörper beschichteten Magnetbeads. Dazu wurden Magnetbeads (100 µl Beadsuspension) mit Hilfe eines caproMags am Boden einer Küvette gesammelt, 5 µl an Fluorescein (8.8 µM, pH = 7.5 – 8) hinzu pipettiert und die UV-Vis-Absorption der Lösung gemessen. Anschließend erfolgte die Resuspension der Beads, gefolgt von einer 30 minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Für das erneute Messen der Absorption wurden die Beads wieder am Boden der Küvette gesammelt. Nach der Zugabe von weiteren 5 µl Fluorescein (8.8 µM, pH = 7.5 – 8) erfolgten die beschriebenen Arbeitsschritte von UV-Vis-Messungen, Resuspendieren, Inkubation und erneutes Messen der UV-Vis-Absorption noch fünfmal. Die graphische Auftragung der gemessenen UV-Vis-Absorption gegen die zugegebene Fluoresceinmenge ergab die Kapazität der Magnetbeads (Abbildung 19)

Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) zur Aufreinigung von Reaktionsprodukten wurde an einer MPLC-Analge von Büchi mit zwei *C-605* Pumpenmodulen, einem *C-635* UV-Vis-Detektor, einer *C-620* Kontrolleinheit und einem *C-660* Fraktionssammler

durchgeführt. Zur Trennung wurden Acetonitril o. Methanol/Wasser (+ 0.1 % H₃CCOOH) verwendet. Als feste Phase wurde das C8-modifizierte Kieselgel *LiChroprep RP-select B* (25 – 40 µm) von Merck verwendet.

Proteine wurden zur Analyse tryptisch fragmentiert und die erhaltenen Peptide mittels einer *Proxeon EASY-nLC* aufgetrennt. Als Lösemittel wurden A (Wasser + 0.1 % HCOOH) und B (MeCN) in einem linearen Gradienten (5 – 35% MeCN, 90min) verwendet. Vorsäule: 5 cm, 100 µm, 100 Å (C18-RP); analytische Säule: 15 cm, 75 µm, 100 Å (C18-RP). Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse mittels *OrbitrapLTQ XL*. Dazu wurde von den 5 bzw. 10 intensivsten Ionen (dynamischer Ausschluss: für nächste Fragmentierung: 60 s) ein MS/MS-Spektrum (Kollisionsenergie: 35 eV) in einem Massenbereich von 300 – 2000 m/z aufgenommen.

Reaktionen unter Wasser- und Luftausschluss wurden in ausgeheizten Glasgeräten in einer Stickstoff- bzw. Argonatmosphäre unter Stickstoff- bzw. Argonüberdruck durchgeführt. Lösemittel und Reagenzien wurden durch ein Septum via Spritze überführt bzw. zugegeben.

Trockene Lösemittel wurden bei den Firmen Acros und Merck erworben.

UV-Stabilitäten wurden in einer *caproBox* von caprotec bioanalytics GmbH bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 310$ nm, $\lambda_{\max} = 350$ nm oder $\lambda_{\max} = 465$ nm, einer Temperatur von 1 – 4 °C und einem Volumen von 100 µl in 200 µl PCR-Gefäßen durchgeführt. Die Konzentration der Proben lag im Bereich von 30 – 60 µM bei anschließender Analyse mittels HPLC-MS. Für die Bestimmung der Farbstoffstabilitäten wurden die Konzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie so eingestellt, dass die Absorption am Absorptionsmaximum im Bereich von 0.6 – 1 lag. Nach Bestrahlung wurden die Proben bis zur Analyse mittels HPLC-MS bzw. UV-Vis-Spektroskopie unter Alufolie gelagert um Verfälschungen durch den Einfluss von Raumlicht zu vermeiden.

UV-Vis-Spektroskopie wurde mit einem *Cary 50 Bio UV-Visible-Spectrometer* von Varian durchgeführt.

Für **Western-Blot-Analysen** wurden die Proteine zwischen zwei GB 003 Gel-Blot-Papieren von Whatmann in einer EasyPhor Elektro-Wet Blot Mini Blot-Kammer von Biozyms auf eine Protean BA 85 Nitrocellulose Blotmembran von Whatmann übertragen.

Zentrifugiert wurde in einer *5418 Centrifuge* von Eppendorf.

4.2 Capture Experimente & nachfolgend Biochemische Analysen

4.2.1 Das On-Bead-Capture-Experiment

In Anlehnung an die literaturbekannte Vorschrift^[11] wurden die Capture-Experimente in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen mit flachen Deckeln durchgeführt. Dazu wurden pro Ansatz 50 µl Beadsuspension mit 25 µl einer 100 µM wässrigen Lösung der entsprechenden Capture Compound bzw. des Scaffoldes versetzt und für 30 min bei 0 – 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads mittels caproMag in den Deckeln der Reaktionsgefäße gesammelt und die Lösung verworfen. Zu den Beads wurde eine Lösung aus 80 µl Mastermix (Lysat/5x Capture-Puffer (100 µM HEPES, 250 µM KOAc, 50 µM Mg(OAc)₂, Glycerol)/ddH₂O - 5:2:1) und 20 µl ddH₂O (Assay-Ansatz u. Scaffold-Ansatz) bzw. 20 µl 1 mM Adenosin-3'-5'-Monophosphat freie Säure (cAMP-Competitor, Competition-Ansatz) gegeben und für 3 h unter leichtem Schwenken bei 0 – 4 °C inkubiert. Für die folgende Belichtung wurden die Proben ohne Deckel 5x für 2 min in der caproBox (0 – 4 °C, $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$) bestrahlt. Nach jeder Zeiteinheit wurden die Proben kurz mit Deckel vorsichtig geschüttelt.

4.2.1 Probenvorbereitung und biochemische Analysen

Waschschritte: Nach erfolgtem Capture Experimente wurden die Beads wieder mittels caproMag abgesammelt und 6x mit in jeweils 100 µl Waschpuffer 1 (50 µM Tris, 1 µM EDTA, 1M NaCl) resuspendiert und erneut abgesammelt. Anschließend wurde die Waschprozedur zweimal mit je 100 µl ddH₂O wiederholt. Die Proben wurden anschließend für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

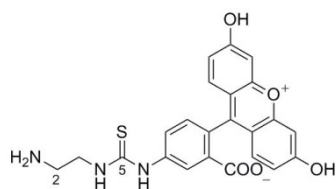
Für eine **massenspektrometrische Analyse** erfolgten noch zusätzlichen Waschschritten und eine enzymatische Fragmentierung (tryptischer Verdau) unter einer Cleanbench. Dazu wurden die Beads erneut mittels caproMag abgesammelt, 2x mit je 100 µl ddH₂O, 2x mit 100 µl eines Acetonitril/ddH₂O-Gemisch (4:1) resuspendiert und erneut abgesammelt. Anschließend wurden die Beads in 10 µl einer 1:10 Mischung aus 0.5 µg/µl Trypsin (Roche Diagnostics Deutschland GmbH) und 100 µM wässriger Ammoniumbicarbonat-Lösung resuspendiert und für 15 – 17 h in einem *BD 115* Brutschrank von Binder bei 37 °C auf einem *MS 3 basic* Schüttler mit einem *MS 3.4* Mikrotiteraufsatz von IKA Werke GmbH & Co. KG inkubiert.

Anschließend wurden die Beads mittels caproMag fixiert, die Überstände abgenommen und für 2 min bei 15000 g in einer *Centrifuge 5418* von Eppendorf zentrifugiert. Nach erneutem Abnehmen der Überstände das Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck mittels einer *miVac DNA vacuum centrifuge* von Genevac Ltd wurden die erhaltenen Proben zur Analyse an die Analytik-Abteilung der caprotec bioanalytics GmbH übergeben.

SDS-Page & Silberfärbung bzw. Western Blot: Nach dem erfolgten Capture-Experiment und den erfolgten Waschschritten wurden die Beads mit 7 µl 4x SDS-Probenpuffer (modifiziert nach Lämmli^[102], 200 µM Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)aminoethan), 40 % Glycerol, 10 % SDS, 1.3M β-Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau Natriumsalz) resuspendiert und zweimal für 5 min bei 90 – 95 °C belassen. Eine Lagerung über Nacht erfolgte ggf. bei –20 °C. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese mit 4 – 20 % Fertiggradientengelen für 10 min bei 120 V und für weitere 90 min bei 180 V. Für die Silberfärbung wurden die Gele anschließend gemäß der Herstelleranweisung mit dem ProteoSilverTM: High Sensitivity Silver Stain-Kit entwickelt. Für einen Anit-Biotin-Western-Blot wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Blot-Kammer zwischen je 2 Gel-Blot-Papieren auf eine Nitrocellulose Blotmembran für 90min bei 66V übertragen. Dazu wurde 1:10 verdünnter methanolfreier 10x Pierce Western-Blot-Transferpuffer verwendet. Anschließend wurden freie Proteinbindestellen der Membran mit 2 % Magermilchpulver in TBS-T Mittels blockiert und die Membran mit Streptavidin-Peroxidase 1:200 in TBS-T für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen mit Pierce ECL Western Blotting Substrate für 1 – 2 min inkubiert. Die dadurch auf den immunomarkierte Blots erzeugten Lichtsignale wurden auf ECL-empfindliche Photofilme übertragen. Die Filme wurden anschließend für min. 30 s in Entwickler, ddH₂O, Fixierer und erneut in ddH₂O getaucht. Bei allen Arbeitsschritten wurde jeweils die Herstelleranweisung befolgt.

4.3 Synthese

4.3.1 Fluorestierende Scaffolds & Capture Compounds

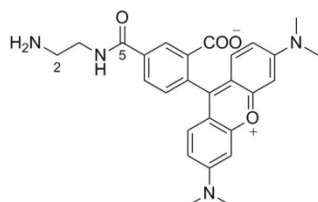


Thioharnstoff 17: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (6 mg, 15 μmol) wurde in Ethylendiamin (1.0 ml) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 min konnte nur Produkt detektiert werden (Methode: Kinetex, Produkt: 2.52 min). Das

Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt **17** (7 mg, 15 μmol) ohne weitere Aufreinigung für folgende Experimente eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.91 (d, $J = 2.2$, 1H, H_{Flu}), 7.67 (dd, $J = 2.2$, 8.2, 1H, H_{Flu}), 7.22 (d, $J = 8.2$, 1H, H_{Flu}), 7.14 (d, $J = 9.2$, 2H, H_{Flu}), 6.54 (dd, $J = 2.2$, 9.2, 2H, H_{Flu}), 6.51 (d, $J = 2.2$, 2H, H_{Flu}), 3.81 (br. t, $J = 5.9$, 2H, $\text{C}(3)\text{H}_2$), 3.02 (br. t, $J = 6.9$, 2H, $\text{C}(2)\text{H}_2$); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 182.1 ($\text{C}(5)$), 173.7 (C_{Flu}), 160.2 (C_{Flu}), 142.5 (C_{Flu}), 140.5 (C_{Flu}), 132.5 (C_{Flu}), 131.7 (C_{Flu}), 131.2 (C_{Flu}), 2x 125.0 (2x C_{Flu}), 123.8 (C_{Flu}), 113.6 (C_{Flu}), 104.4 (C_{Flu}), 46.0 ($\text{C}(3)$), 41.3 ($\text{C}(2)$); **m/z :** 302 (5), 364 (22), 372 (16), 389 (100), 406 (19), 433 (9);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 450.11182,
gefunden: 450.11077.

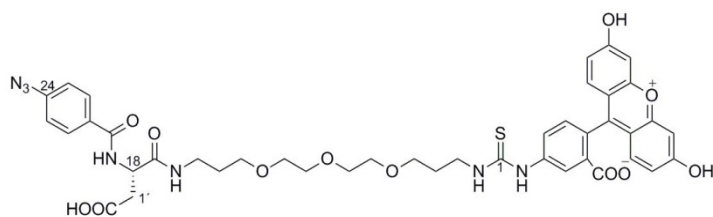


Amid 18: Zu einer Lösung von TAMRA-NHS (1 mg, 2 μmol) in DMF (0.5 ml) wurde Ethylendiamin (5 μl , 76 μmol) gegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 10 min konnte vollständiger Umsatz detektiert werden (Methode: Kinetex,

Produkt: 2.32 min). Das Lösemittel wurde samt Ethylendiamin unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels basischer MPLC (0 \rightarrow 30 % MeCN) gereinigt. Das gereinigte Produkt **18** wurde in Lösung belassen und nach entfernen von MeCN so für die Untersuchungen der Photostabilität eingesetzt.

m/z : 297 (19), 329 (10), 341 (45), 367 (15), 386 (17), 418 (9), 430 (9), 456 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 473.21833,
gefunden: 473.21838.

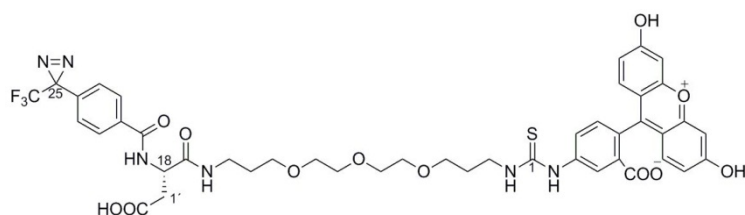


Scaffold 24: Zu einer 0 °C kalten Lösung von Amin **20** (178 mg, 300 µmol) und FITC (39 mg, 100 µmol) in DMF (1.0 ml) wurde

unter Lichtausschluss DIPEA (85 µl, 500 µmol) gegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung für 5 h gerührt und es wurde vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Screening, Produkt: 7.97 min). Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck und 2maliger Aufreinigung mittels basischer MPLC (0 → 50 % MeOH) wurde das Produkt **24** zu 59 % (51 mg, 59 µmol) als oranger Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.17 (br.d, $J = 1.9$, 1H, H_{Flu}), 7.89/7.10 (AA'/BB', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.76 (dd, $J = 1.7$, 8.2, 1H, H_{Flu}), 7.10 (m, 1H, H_{Flu}), 6.74 (s, 1H, H_{Flu}), 6.72 (s, 1H, H_{Flu}), 6.67 (2s, 2H, H_{Flu}), 6.57 (d, $J = 2.4$, 1H, H_{Flu}), 6.54 (d, $J = 2.4$, 1H, H_{Flu}), 4.80 (t, $J = 6.4$, 1H, C(18)-H), 3.70 (br. s, 2H, C(3)H₂), 3.61 – 3.51 (m, 10H, C(5)H₂ – C(11)H₂), 3.49 (t, $J = 6.1$, 2H, C(13)H₂), 3.28 (dt, $J = 2.5$, 6.5, 2H, C(15)H₂), 2.76 (d, $J = 6.4$, 2H, C(1')H₂), 1.91 (quint, 2H, $J = 6.3$, C(4)H₂), 1.74 (quint, 2H, $J = 6.3$, C(14)H₂); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 182.6 (C(1)), 177.4 (C(2')), 173.9 (C(17)), 171.6 (C_{Flu}), 168.8 (C(20)), 163.5, 154.8, (2x C_{Flu}), 145.1 (C(21)), 142.5 (C_{Flu}), 131.6 (C(24)), 130.6 (C_{Flu}), 130.5 (C(22)), 126.3 (C_{Flu}), 120.0 (C(23)), 114.7, 112.2, 103.6 (3x C_{Flu}), 71.4 (C(8), C(10)), 71.1 (C(7), C(11)), 70.3 (C(5)), 69.8 (C(13)), 53.1 (C(18)), 43.6 (C(3)), 39.4 (C(1')), 38.0 (C(15)), 30.2 (C(14)), 29.9 (C(4)); **m/z:** 338 (4), 366 (12), 390 (5), 453 (32), 481 (100), 871 (25);

Exakte Masse: m/z für C₄₂H₄₃N₇O₁₂S [M-H]⁺ berechnet: 870.27632,
gefunden: 870.27609.



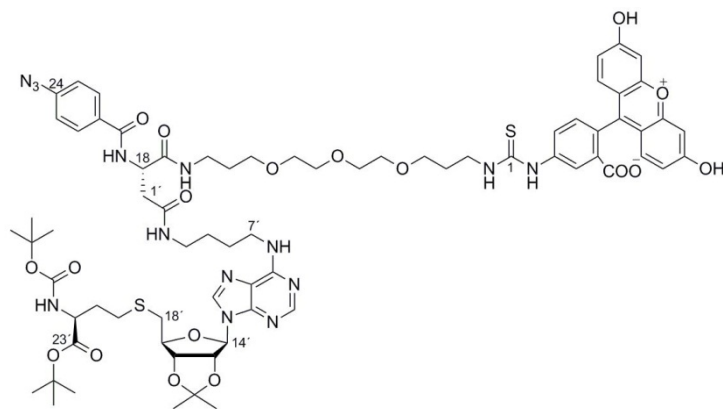
Scaffold 25: Zu einer 0 °C kalten Lösung von Amin **21** (194 mg, 293 µmol) und FITC (114 mg, 293 µmol) in DMF (5.8 ml) wurde

unter Lichtausschluss DIPEA (251 µl, 1.5 mmol) gegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Es konnte vollständiger Umsatz detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 10.70 min). Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck und Aufreinigung mittels basischer MPLC (0 → 30 % MeOH) wurde das Produkt **25** zu 72% (198 mg, 211 µmol) als oranger Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.13 (br.d, $J = 2.0$, 1H, H_{Flu}), 7.95/7.33 (AA'/BB', $J = 8.3$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.77 (dd, $J = 1.8$, 8.2, 1H, H_{Flu}), 7.14 (br.d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.81 (s, 1H, H_{Flu}), 6.79 (s, 1H, H_{Flu}), 6.68 (s, 1H, H_{Flu}), 6.67 (s, 1H, H_{Flu}), 6.59 (d, $J = 2.4$, 1H, H_{Flu}), 6.57 (d, $J = 2.4$, 1H,

H_{Flu}), 4.78 (t, $J = 6.4$, 1H, C(18)-H), 3.72 (br. s, 2H, C(3) H_2), 3.63 – 3.52 (m, 10H, C(5) H_2 – C(11) H_2), 3.50 (t, $J = 6.1$, 2H, C(13) H_2), 3.29 – 3.26 (m, 2H, C(15) H_2), 2.72 (dd, $J = 3.7$, 6.5, 2H, C(1') H_2), 1.93 (quint, 2H, $J = 6.3$, C(4) H_2), 1.74 (quint, 2H, $J = 6.4$, C(14) H_2); **^{13}C -NMR, MeOD δ** : 182.5 (C(1)), 177.5 (C(2')), 173.8 (C(17)), 171.6 (C_{Flu}), 168.4 (C(20)), 164.0, 155.1, 142.5 (3x C_{Flu}), 136.7 (C(24)), 133.2 (C(21)), 130.8 (C_{Flu}), 129.0 (C(22)), 127.6 (C(23)), 126.5 (C_{Flu}), 123.4 (q, $J = 274$, C(26)), 115.1, 112.4, 103.6 (3x C_{Flu}), 71.3 (C(8), C(10)), 71.1 (C(7), C(11)), 70.3 (C(5)), 69.8 (C(13)), 53.2 (C(18)), 43.6 (C(3)), 39.6 (C(1')), 38.0 (C(15)), 30.2 (C(14)), 29.9 (C(4)), 29.4 (q, $J = 41$, C(25)); **m/z**: 323 (10), 424 (5), 445 (21), 865 (100), 893 (34), 917 (11), 937 (18);

Exakte Masse: m/z für C₄₄H₄₃F₃N₆O₁₂S [M-H]⁺ berechnet: 937.26901,
gefunden: 937.26642.



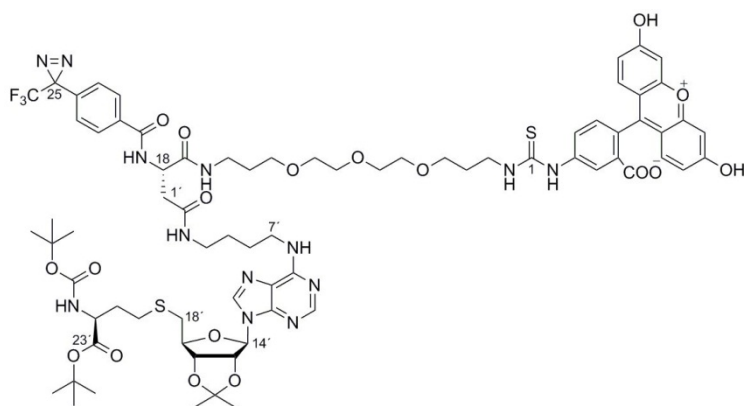
SAH-CC 27: Zu einer Lösung von Scaffold **24** (22 mg, 25 μmol) und SAH **26** (17 mg, 25 μmol) in DMA (2.8 ml) wurde DIPEA (11 μl , 63 μmol) gegeben. Nach der Zugabe von HATU (12 mg, 32 μmol) wurde die Reaktionslösung unter Lichtaus-

schluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min konnte vollständiger Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 6.75 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels basischer MPLC (0 \rightarrow 60 % MeOH) und lieferte die SAH-CC **27** zu 63 % (24 mg, 16 μmol) als orangen Feststoff.

^1H -NMR, MeOD δ : 8.23 (s, 1H, H_{Purin}), 8.20 (s, 1H, H_{Purin}), 8.11 (br.d, $J = 1.8$, 1H, H_{Flu}), 7.84/7.03 (AA'/BB', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.75 (br. d, $J = 8.5$, 1H, H_{Flu}), 7.14 (d, $J = 8.2$, 1H, H_{Flu}), 6.71 (d, $J = 2.0$, 1H, H_{Flu}), 6.69 (d, $J = 2.0$, 1H, H_{Flu}), 6.66 (2d, $J = 1.1$, 2H, H_{Flu}), 6.54 (t, $J = 2.5$, H, H_{Flu}), 6.52 (t, $J = 2.5$, 1H, H_{Flu}), 6.15 (d, $J = 2.4$, 1H, C(14')-H), 5.48 (dd, $J = 1.9$, 6.2, 1H, C(15')-H), 5.05 (dd, $J = 3.0$, 6.3, 1H, C(16')-H), 4.86 (m, 1H, C(18)-H), 4.32 (m, 1H, C(17')-H), 4.09 (dd, $J = 4.7$, 9.0, 1H, C(22')-H), 3.71 (br. s, 2H, C(3) H_2), 3.59 – 3.54 (m, 10H, C(5) H_2 – C(11) H_2), 3.50 (m, 2H, C(7') H_2), 3.46 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.26 (t, $J = 6.6$, 2H, C(15) H_2), 3.24 – 3.16 (m, 2H, C(4') H_2), 2.85 – 2.69 (m, 4H, C(1') H_2 , C(18') H_2), 2.59 (m, 1H, C(20')- H_a), 2.52 (m, 1H, C(20')- H_a), 1.90 (quint, 2H, $J = 6.2$, C(4) H_2), 1.90 (m, 1H, C(21')- H_a), 1.72 (quint, 2H, $J = 6.4$, C(14) H_2), 1.72 (m, 1H, C(21')- H_a), 1.67 – 1.61 (m, 2H,

$C(6')H_2$), 1.58 (s, 3H, i Pr), 1.58 – 1.53 (m, 2H, $C(5')H_2$), 1.42 (s, 18H, 2x t Bu), 1.37 (s, 3H, i Pr); ^{13}C -NMR, MeOD δ : 182.7 (C(1)), 173.3 (C(17)), 172.4 (C(2')), 171.4 (C=O), 168.6 (C(20)), 156.2 (C_{Flu}), 154.7 (C_{Flu}), 154.1 (C_{Purin}), 145 (C(21)), 142.3 (C_{Flu}), 141.2 (C_{Purin}), 131.4 (C(24)), 130.5 (C(22), C_{Flu}), 120 (C(23), C_{Flu}), 115.5 ($C(i$ Pr)), 114.8 (2x C_{Flu}), 112.0 (C_{Flu}), 103.6 (2x C_{Flu}), 91.6 (C(14')), 87.9 (C(17')), 85.2, 85.1 (C(15'), C(16')), 82.7, 80.5 (2x $C(t$ Bu)), 71.4, 71.3 (C(10), C(8)), 71.1 (C(11), C(7)), 69 (C(13), C(5)), 54.7 (C(22')), 52.8 (C(18)), 43.6 (C(3)), 41.3 (C(7')), 40.1 (C(4')), 38.7 (C(1')), 38.2 (C(15)), 34.9 (C(18')), 32.7 (C(21')), 30.2 (C(14)), 29.9 (C(4)), 29.5 (C(20')), 28.7, 28.4 (2x $C(t$ Bu)), 27.7 (C(5'), C(6')), 27.4, 25.6 (2x $C(i$ Pr)); m/z : 390 (100), 593 (9), 674 (12), 702 (41), 735 (8), 958 (18), 1014 (49), 1058 (11), 1115 (20);

Exakte Masse: m/z für $C_{72}H_{90}N_{14}O_{18}S_2$ $[M-H]^+$ berechnet: 752.30723,
 gefunden: 752.30779.



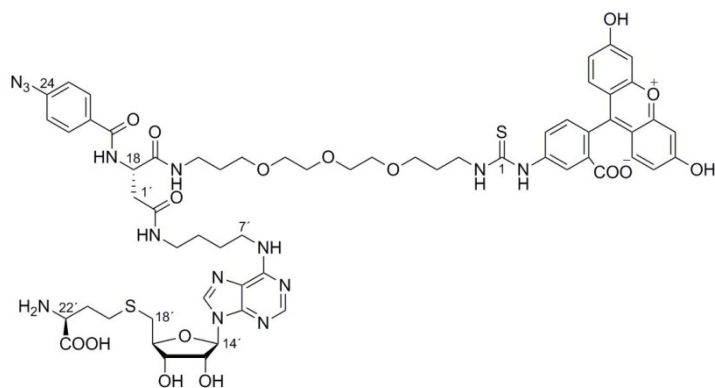
SAH-CC 28: Zu einer Lösung von Scaffold **25** (10 mg, 11 μ mol) und SAH **26** (8 mg, 12 μ mol) in DMA (2.0 ml) wurde DIPEA (2 μ l, 12 μ mol) gegeben. Nach der Zugabe von HATU (5 mg, 12 μ mol) wurde die Reaktionslösung unter Lichtaus-

schluss bei Raumtemperatur gerührt bis nach 30 min vollständiger Umsatz detektiert wurde (Methode: Screening, Produkt: 11.42 min). Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels basischer MPLC (0 \rightarrow 40 % MeCN) und lieferte die SAH-CC **28** zu 54 % (9 mg, 6 μ mol) als orangen Feststoff.

1H -NMR, MeOD δ : 8.24 (s, 1H, H_{Purin}), 8.21 (s, 1H, H_{Purin}), 7.97 (br. s, 1H, H_{Flu}), 7.94/7.27 (AA'/BB', J = 8.3, 4H, $H_{arom.}$), 7.73 (br. d, J = 7.8, 1H, H_{Flu}), 7.19 (d, J = 8.2, 1H, H_{Flu}), 7.08 (d, J = 5.0, 1H, H_{Flu}), 7.06 (d, J = 5.1, 1H, H_{Flu}), 6.65 (d, J = 2.3, 1H, H_{Flu}), 6.64 (d, J = 2.2, 1H, H_{Flu}), 6.60 (m, 2H, H_{Flu}), 6.16 (d, J = 2.4, 1H, $C(14')$ -H), 5.50 (dd, J = 1.9, 6.2, 1H, $C(15')$ -H), 5.07 (dd, J = 2.9, 6.4, 1H, $C(16')$ -H), 4.87 (m, 1H, $C(18)$ -H), 4.33 (m, 1H, $C(17')$ -H), 4.09 (dd, J = 4.7, 9.1, 1H, $C(22')$ -H), 3.73 (br. s, 2H, $C(3')H_2$), 3.61 – 3.45 (m, 12H, $C(5)H_2$ – $C(11)H_2$, $C(7')H_2$), 3.47 (t, J = 6.1, 2H, $C(13)H_2$), 3.30 – 3.27 (m, 2H, $C(15)H_2$), 3.24 – 3.10 (m, 2H, $C(4')H_2$), 2.85 – 2.75 (m, 2H, $C(18')H_2$), 2.75 (dd, J = 5.7, 14.7, 1H, $C(1')$ - H_a), 2.67 (dd, J = 8.0, 14.7, 1H, $C(1')$ - H_b), 2.58 (m, 1H, $C(20')$ - H_a), 2.51 (m, 1H, $C(20')$ - H_b), 1.92 (m, 1H, $C(21')$ - H_a), 1.92 (quint, J = 6.3, 2H, $C(4)H_2$), 1.79 (m, 1H, $C(20')$ -

H_b), 1.72 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(14) H_2), 1.67 – 1.60 (m, 2H, C(6') H_2), 1.56 – 1.47 (m, 2H, C(5') H_2), 1.59 (s, 3H, ⁱPr), 1.42 (s, 18H, 2x ^tBu), 1.38 (s, 3H, ⁱPr); ¹³C-NMR, MeOD δ : 182.1 (C(1)), 173.3 (C(17)), 172.3 (C(2')), 168.4 (C(20)), 156.3 (C_{Flu}), 155.4 (C_{Flu}), 154.2 (C_{Purin}), 141.2 (C_{Purin}), 136.5 (C(24)), 133.3 (C(21)), 132.2 (2x C_{Flu}), 129.4 (C(22), (C_{Flu})), 127.6 (C(23)), 124.8 (C_{Flu}), 122.8 (C_{Flu}), 120.1 (C_{Flu}), 115.5 (C(ⁱPr)), 111.9 (C_{Flu}), 103.9 (2x C_{Flu}), 91.6 (C(14')), 88.0 (C(17')), 85.2 (C(15')), 85.1 (C(16')), 82.7, 80.5 (2x C(^tBu)), 71.4 (C(8), C(10)), 71.2, 71.1 (C(7), C(11)), 69.9 (C(5), C(13)), 54.6 (C(22')), 53.0 (C(18)), 44.1 (C(3)), 38.7 (C(1')), 41.2 (C(7')), 40.1 (C(4')), 38.1 (C(15)), 34.9 (C(18')), 32.7 (C(21')), 30.3 (C(14)), 29.9 (C(4)), 29.5 (C(20')), 28.7, 28.3 (2x C(^tBu)), 27.7 (C(5'), C(6')), 27.4, 25.5 (2x C(ⁱPr));

Exakte Masse: m/z für C₇₄H₉₀F₃N₁₃O₁₈S₂ [M-H]⁺ berechnet: 937.26901,
 gefunden: 937.26642.

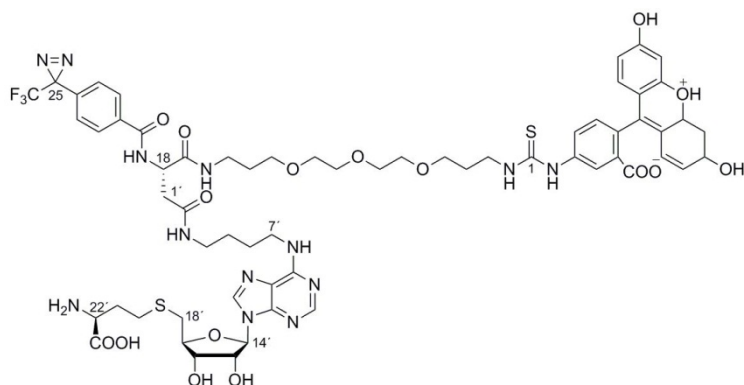


SAH-CC 29: Die geschützte SAH-CC **27** (5 mg, 3 μ mol) wurde in DCM (2.5 ml) gelöst und auf – 20 °C ab-gekühlt. Nach der Zugabe von 4M HCl in Dioxan (105 μ l, 419 μ mol) wurde die Reaktionslösung bei – 20 °C übers

Wochenende gerührt. Es wurde voll-ständiger Umsatz detektiert (Methode: Screening, Produkt: 7.21 min). Das Lösemittel wurde unter vermindertem bei – 20 °C entfernt und der erhaltene Rückstand mit TEA (1.0 ml) versetzt. Nach erneutem Einengen und anschließender Reinigung mittels basischer MPLC (10 → 30 % MeOH) wurde das Produkt **29** als oranger Feststoff zu 21 % (1 mg, 1 μ mol) erhalten.

m/z: 444 (100), 1058 (6), 1307 (95);

Exakte Masse: m/z für C₆₀H₇₀N₁₄O₁₆S₂ [M-H]⁺ berechnet: 1307.46084,
 gefunden: 1307.45997.

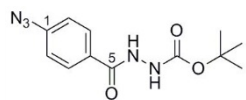


SAH-CC 30: Die geschützte SAH-CC **28** (27 mg, 17 μ mol) wurde in DCM (24.0 ml) gelöst, mit H₂O (8 μ l, 430 μ mol) versetzt und auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Nach der Zugabe von 4M HCl in Dioxan (430 μ l, 1.7 mmol) wurde

die Reaktionslösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gerührt. Es wurde vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Screening, Produkt: 8.69 min), das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mit TEA (1.0 ml) und DCM (25.0 ml) versetzt. Nach erneutem Einengen und anschließender Reinigung mittels basischer MPLC (10 \rightarrow 50 % MeOH, 20 \rightarrow 35 % MeOH, 25 % MeOH) wurde SAH-CC **30** als oranger Feststoff zu 31 % (7 mg, 5 μ mol) erhalten.

¹H-NMR, DMSO δ : 9.36 (br. s, 1H, N(2)-H), 8.82 (d, 1H, $J = 7.7$, N(19)-H), 8.38 (br. s, 1H, H_{Flu}), 8.35 (s, 1H, H_{Purin}), 8.21 (s, 1H, H_{Purin}), 7.98 – 7.94 (m, 1H, N(3')-H), 7.97/7.37 (AA'/BB', $J = 8.3$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.92 (t, 1H, $J = 5.7$, N(16)-H), 7.88 (dd, $J = 1.9, 8.3$, 1H, H_{Flu}), 7.76 (br. s, 1H, N(8')-H), 7.14 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.68 (br. d, $J = 2.1$, 2H, H_{Flu}), 6.59 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Flu}), 6.55 (dd, $J = 2.1, 8.6$, 2H, H_{Flu}), 5.89 (d, $J = 5.7$, 1H, C(14')-H), 4.79 (br. s, 1H, C(15')-H), 4.69 (dd, $J = 7.1, 14.6$, 1H, C(18)-H), 4.16 (br. t, $J = 4.1$, 1H, C(16')-H), 4.02 (m, 1H, C(17')-H), 3.55 – 3.49 (m, 2H, C(3) H_2), 3.48 – 3.43 (m, 6H, C(8) H_2 , C(9) H_2 , C(7')), 3.42 – 3.33 (m, 7H, C(5) H_2 , C(7) H_2 , C(11) H_2 , C(22')-H), 3.35 – 3.31 (m, 2H, C(13) H_2), 3.10 – 3.01 (m, 4H, C(15) H_2 , C(4') H_2), 2.93 (dd, $J = 6.0, 13.8$, 1H, C(18')- H_a), 2.81 (dd, $J = 6.9, 13.8$, 1H, C(18')- H_b), 2.64 (t, $J = 7.6$, 2H, C(20') H_2), 2.60 – 2.54 (m, 2H, C(1') H_2), 2.04 (m, 1H, C(21')- H_a), 1.86 (m, 1H, C(21')- H_b), 1.79 (quint, 2H, $J = 6.8$, C(4) H_2), 1.58 (quint, 2H, $J = 6.7$, C(14) H_2), 1.57 – 1.51 (m, 2H, C(6') H_2), 1.44 – 1.34 (m, 2H, C(5') H_2); **¹³C-NMR, DMSO δ :** 171.4 (C(23')), 170.6 (C(17)), 169.4 (C(2')), 168.6 (C_{Flu}), 164.9 (C(20)), 159.8 (C_{Flu}), 152.0 (C_{Purin}), 148.6 (C_{Purin}), 142.1 (C_{Flu}), 139.9 (C_{Purin}), 135.7 (C(24)), 133.2 (C_{Flu}), 132.4 (C_{Flu}), 130.3 (C(21)), 129.3 (C_{Flu}), 129.1 (C_{Flu}), 129.0 (C_{Flu}), 128.7 (C(22)), 126.5 (C_{Flu}), 126.3 (C(23)), 123.7 (C_{Flu}), 120.4 (C_{Flu}), 119.4 (C_{Purin}), 115.8 (C_{Flu}), 112.4 (C_{Flu}), 102.3 (C_{Flu}), 87.5 (C(14')), 83.7 (C(17')), 72.6 (C(15'), C(16')), 69.7 (C(8), C(10)), 69.5 (C(7), C(11)), 68.1, 68.0 (C(5), C(13)), 52.9 (C(22)), 51.1 (C(18)), 41.1 (C(3)), 38.4 (C(4')), 37.5 (C(1')), 36.0 (C(15)), 33.7 (C(18')), 30.4 (C(21')), 29.4 (C(4)), 28.6 (C(14)), 27.8 (C(20')), 26.4 (C(6')), 25.8 (C(5')); **m/z:** 444 (100), 468 (21), 519 (349), 541 (68), 578 (42), 648 (32), 732 (60), 779 (24), 833 (40), 872 (22), 956 (45), 1109 (31), 1301 (82);

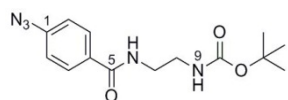
Exakte Masse: m/z für $C_{62}H_{70}F_3N_{13}O_{16}S_2$ $[M-H]^+$ berechnet: 1374.45353,
 gefunden: 1374.45555.



Amid 33: Zu einer Lösung von *p*-Azidobenzoesäure (40 mg, 245 μ mol), Boc-Hydrazin (36 mg, 270 μ mol) und DIPEA (46 μ l, 270 μ mol) in DMA (2.0 ml) wurde HATU (103 mg, 270 μ mol) gegeben und bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht gerührt. Nach 4 h 30 min konnte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.67 min) festgestellt werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach anschließender Reinigung mittels MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) wurde das Produkt **33** zu 91 % (62 mg, 224 μ mol) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

1H -NMR, $CDCl_3$ δ : 8.75 (br. s, 1H, N(6)-H), 7.80/6.98 (AA'/BB', J = 8.5, 4H, $H_{arom.}$), 6.87 (br. s, 1H, N(6)-H), 1.48 (s, 9H, tBu); ^{13}C -NMR, $CDCl_3$ δ : 166.0 (C(5)), 156.2 (C(8)), 144.2 (C(4)), 129.3 (C(3)), 128.2 (C(1)), 119.2 (C(2)), 82.3 (C(tBu)), 28.2 (C(tBu)); m/z: 178 (9), 236 (100), 250 (7), 264 (9);

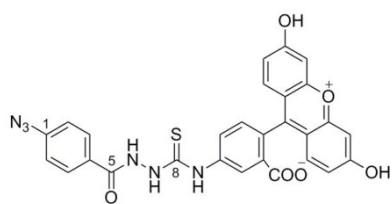
Exakte Masse: m/z für $C_{12}H_{15}N_5O_3$ $[M-H]^+$ berechnet: 278.12477,
 gefunden: 278.12468.



Amid 34: Zu einer Lösung von *p*-Azidobenzoesäure (40 mg, 245 μ mol), Boc-Ethylendiamin (43 mg, 270 μ mol) und DIPEA (46 μ l, 270 μ mol) in DMA (2.0 ml) wurde HATU (103 mg, 270 μ mol) gegeben und bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht gerührt. Nach 4 h 30 min konnte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 86 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung mittels MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) wurde das Produkt **34** zu 93 % (70 mg, 229 μ mol) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

1H -NMR, $CDCl_3$ δ : 7.82/7.03 (AA'/BB', J = 8.6, 4H, $H_{arom.}$), 7.37 (br. s, 1H, N(6)-H), 5.13 (br. s, 1H, N(9)-H), 3.55 – 3.51 (m, 2H, C(7) H_2), 3.40 – 3.38 (m, 2H, C(8) H_2), 1.41 (s, 9H, tBu); ^{13}C -NMR, $CDCl_3$ δ : 167.0 (C(5)), 157.8 (C(10)), 143.4 (C(4)), 130.8 (C(1)), 129.0 (C(3)), 119.1 (C(2)), 80.2 (C(tBu)), 42.4 (C(7)), 40.2 (C(8)), 28.5 (C(tBu)); m/z: 166 (81), 197 (10), 213 (34), 257 (8), 277 (10), 300 (14);

Exakte Masse: m/z für $C_{14}H_{19}N_5O_3$ $[M-H]^+$ berechnet: 309.15607,
 gefunden: 309.15578.

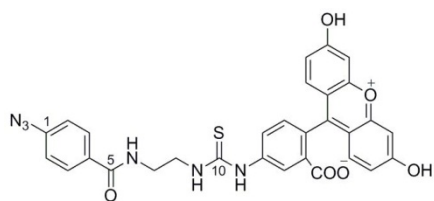


Amid 35: Zu einer Lösung des Boc-geschützten Amins **33** (20 mg, 72 μ mol) in DCM (2.0 ml) wurde TFA (556 μ l, 7.2 mmol) gegeben und die Lösung für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend

war kein geschütztes Amin mehr detektierbar (Methode: Kinetex, freies Amin: 2.13 min) und das Lösemittel wurde samt Säure unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMF (2.0 ml) aufgenommen und mit DIPEA (123 μ l, 721 μ mol) versetzt. Nach Zugabe von FITC (31 mg, 72 μ mol) wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde vollständiger Umsatz festgestellt (Methode: Kinetex, Produkt: 3.72 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung mittels basischer MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) wurde das Produkt **35** zu 78 % (32 mg, 56 μ mol) als oranger, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.18 (br.s, 1H, H_{Flu}), 8.00/7.17 (AA'/BB', $J = 8.6$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.87 (dd, $J = 1.9$, 8.2, 1H, H_{Flu}), 7.14 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.67 (d, $J = 2.3$, 1H, H_{Flu}), 6.64 (d, $J = 8.7$, 1H, H_{Flu}), 6.52 (dd, $J = 2.3$, 8.7, 1H, H_{Flu}); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 184.3 (C(8)), 171.1 (C_{Flu}), 168.7 (C(5)), 161.5 (C_{Flu}), 154.2 (C_{Flu}), 145.7 (C(4)), 142.2 (C_{Flu}), 130.9 (C(3)), 130.3 (C_{Flu}), 129.8 (C(1)), 128.8 (C_{Flu}), 125.4 (C_{Flu}), 120.1 (C(2)), 113.7 (C_{Flu}), 111.4 (C_{Flu}), 103.5 (C_{Flu}); **m/z:** 390 (100), 429 (3), 539 (5);

Exakte Masse: m/z für C₂₈H₁₈N₆O₆S [M-H]⁺ berechnet: 567.10813,
gefunden: 567.10837.



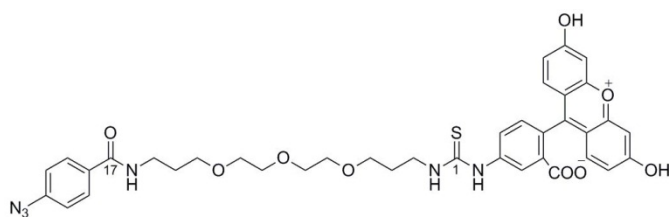
Amid 36: Zu einer Lösung des Boc-geschützten Amins **34** (20 mg, 66 μ mol) in DMC (2.0 ml) wurde TFA (202 μ l, 2.6 mmol) gegeben und die Lösung für 2 h 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt.

Anschließend war kein geschütztes Amin mehr detektierbar (Methode: Kinetex, freies Amin: 1.82 min) und das Lösemittel wurde samt Säure unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMF (2.0 ml) erneut aufgenommen und mit DIPEA (56 μ l, 328 μ mol) versetzt. Nach Zugabe von FITC (26 mg, 66 μ mol) wurde weiter für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Kinetex, Produkt: 3.76 min) und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels basischer MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) gereinigt und das Produkt **36** zu 87% (34mg, 57 μ mol) als oranger, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.08 (d, $J = 1.4$, 1H, H_{Flu}), 7.84/7.06 (AA'/BB', $J = 8.6$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.70 (d, $J = 7.8$, 1H, H_{Flu}), 7.10 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.68 (d, $J = 2.4$, 2H, H_{Flu}), 6.66 (d, $J = 8.7$,

2H, H_{Flu}), 6.51 (dd, $J = 2.5, 8.7$, 2H, H_{Flu}), 3.88 (br. s, 2H, $\text{C}(8)\text{H}_2$), 3.66 – 3.62 (m, 2H, $\text{C}(7)\text{H}_2$); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 183.3 (C(10)), 171.1 (C_{Flu}), 169.7 (C(5)), 161.5 (C_{Flu}), 154.2 (C_{Flu}), 150.0 (C_{Flu}), 144.9 (C(4)), 142.0 (C_{Flu}), 132.4 (C_{Flu}), 131.7 (C(1)), 130.4 (C_{Flu}), 130.3 (C(3)), 129.1 (C_{Flu}), 125.9 (C_{Flu}), 120.8 (C_{Flu}), 119.9 (C(2)), 113.7 (C_{Flu}), 111.4 (C_{Flu}), 103.5 (C_{Flu}), 45.3 (C(8)), 40.7 (C(7)); m/z : 390 (30), 465 (100), 481 (10), 507 (62), 550 (14), 567 (42);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 595.13943,
 gefunden: 595.13960.

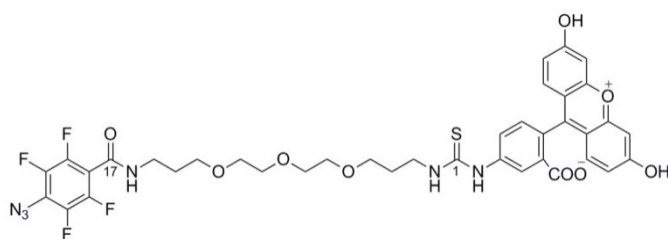


Amid 41: Zu einer Lösung von Thioharn-stoff **37** (20 mg, 32 μmol) und DIPEA (11 μl , 64 μmol) in DMA (1.0 ml) wurde NHS-Ester **38** (17 mg, 64 μmol) gegeben.

Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.86 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhalten Rückstand wurde mittels basischer MPLC (0 \rightarrow 30 % MeCN) gereinigt und das Amid **41** zu 75 % (18 mg, 24 μmol) als oranger, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.02 (d, $J = 2.0$, 1H, H_{Flu}), 7.82/7.10 (AA'/BB', $J = 8.6$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.72 (br. d, $J = 7.7$, 1H, H_{Flu}), 7.15 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.95 (d, $J = 9.0$, 2H, H_{Flu}), 6.66 (d, $J = 2.3$, 2H, H_{Flu}), 6.59 (dd, $J = 2.3, 9.0$, 2H, H_{Flu}), 3.71 (br. s, 2H, $\text{C}(3)\text{H}_2$), 3.64 – 3.60 (m, 4H, $\text{C}(10)\text{H}_2$, $\text{C}(8)\text{H}_2$), 3.60 – 3.56 (m, 6H, $\text{C}(11)\text{H}_2$, $\text{C}(7)\text{H}_2$, $\text{C}(5)\text{H}_2$), 3.55 (t, $J = 6.1$, 2H, $\text{C}(13)\text{H}_2$), 3.44 (t, $J = 6.8$, 2H, $\text{C}(15)\text{H}_2$), 1.90 (quint, $J = 6.4$, 2H, $\text{C}(4)\text{H}_2$), 1.85 (quint, $J = 6.5$, 2H, $\text{C}(14)\text{H}_2$); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 182.3 (C(1)), 172.1 (C_{Flu}), 169.3 (C_{Flu}), 169.0 (C(17)), 156.8 (C_{Flu}), 144.8 (C(18)), 141.8 (C_{Flu}), 135.9 (C_{Flu}), 132.3 (C(21)), 131.6 (C_{Flu}), 130.2 (C(19)), 128.6 (C_{Flu}), 122.6 (C_{Flu}), 120.0 (C(20)), 117.9 (C_{Flu}), 113.8 (C_{Flu}), 103.8 (C_{Flu}), 71.5, 71.4 (C(10), C(8)), 71.3, 71.2 (C(11), C(7)), 2x 70.3 (C(13), C(5)), 43.8 (C(3)), 38.8 (C(15)), 30.5 (C(14)), 30.0 (C(4)); m/z : 324 (11), 387 (7), 429 (100), 445 (32), 579 (7), 649 (6), 732 (9), 833 (7);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 755.24937,
 gefunden: 755.24962.

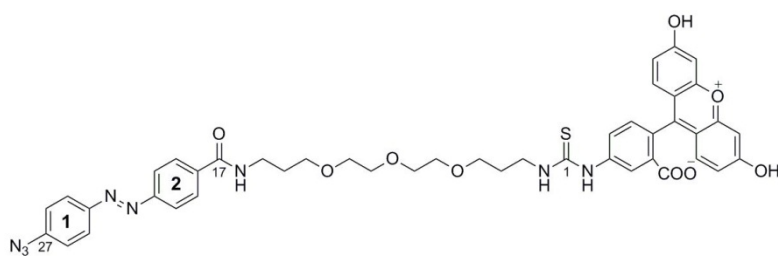


Amid 42: Zu einer Lösung von Thioharnstoff **37** (10 mg, 16 μ mol), Tetrafluor-azidobenzoessäure **40** (4 mg, 18 μ mol) und DIPEA (6 μ l, 36 μ mol) wurde HATU (79 mg, 18 μ mol)

gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Die HPLC-MS zeigte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.96min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (15 \rightarrow 55 % MeCN) gereinigt und das Produkt **42** zu 49 % (7 mg, 8 μ mol) als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.09 (d, $J = 1.8$, 1H, H_{Flu}), 7.76 (br. d, $J = 8.0$, 1H, H_{Flu}), 7.16 (d, $J = 8.3$, 1H, H_{Flu}), 6.70 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Flu}), 6.67 (d, $J = 2.4$, 2H, H_{Flu}), 6.54 (dd, $J = 2.4$, 8.7, 2H, H_{Flu}), 3.73 (br. s, 2H, $\text{C}(3)H_2$), 3.65 – 3.57 (m, 10H, $\text{C}(11)H_2 - \text{C}(5)H_2$), 3.55 (t, $J = 6.2$, 2H, $\text{C}(13)H_2$), 3.46 (t, $J = 6.8$, 2H, $\text{C}(15)H_2$), 1.92 (quint, $J = 6.3$, 2H, $\text{C}(4)H_2$), 1.84 (quint, $J = 6.5$, 2H, $\text{C}(14)H_2$); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 182.6 ($\text{C}(1)$), 171.2 (C_{Flu}), 161.9 (C_{Flu}), 160.0 ($\text{C}(17)$), 154.4 (C_{Flu}), 148.7 (C_{Flu}), 142.4 (C_{Flu}), 131.6 (C_{Flu}), 130.4 (C_{Flu}), 126.0 (C_{Flu}), 120.0 (C_{Flu}), 114.0 (C_{Flu}), 111.7 (C_{Flu}), 103.5 (C_{Flu}), 71.5, 71.4 ($\text{C}(10)$, $\text{C}(8)$), 71.3, 71.1 ($\text{C}(11)$, $\text{C}(7)$), 70.4 ($\text{C}(5)$), 69.4 ($\text{C}(13)$), 43.7 ($\text{C}(3)$), 38.4 ($\text{C}(15)$), 30.2 ($\text{C}(14)$), 29.9 ($\text{C}(4)$); **m/z:** 421 (9), 431 (13), 445 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 827.21169,
gefunden: 827.21336.



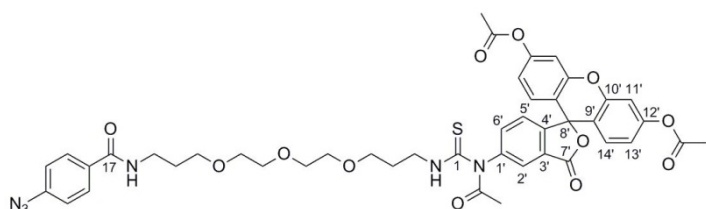
Amid 43: Zu einer Lösung von Thioharnstoff **37** (10 mg, 16 μ mol), Azidoazobenzoessäure **39** (5 mg, 18 μ mol) und DIPEA (6 μ l, 36 μ mol) in

DMA (2.0 ml) wurde HATU (7 mg, 18 μ mol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Die HPLC-MS zeigte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 4.18 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 \rightarrow 60 % MeCN) gereinigt und das Produkt **43** zu 34 % (5 mg, 6 μ mol) als schwach orange/roter, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.08 (d, $J = 1.9$, 1H, H_{Flu}), 7.97/7.92 (2A2A'/2B2B', $J = 8.8$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.96/7.23 (1A1A'/1B1B', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.73 (d, $J = 8.0$, 1H, H_{Flu}), 7.12 (d, $J = 8.4$, 1H,

H_{Flu}), 6.66 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Flu}), 6.66 (d, $J = 2.4$, 2H, H_{Flu}), 6.52 (dd, $J = 2.4$, 8.6, 2H, H_{Flu}), 3.71 (br. s, 2H, $C(3)H_2$), 3.66 – 3.56 (m, 12H, $C(13)H_2 - C(5)H_2$), 3.50 (t, $J = 6.8$, 2H, $C(15)H_2$), 1.90 (quint, $J = 6.1$, 2H, $C(4)H_2$), 1.89 (quint, $J = 6.4$, 2H, $C(14)H_2$); $^{13}\text{C-NMR}$, **MeOD** δ : 182.6 (C(1)), 171.2 (C_{Flu}), 169.3 (C(17)), 161.3 (C_{Flu}), 155.5 (C(18)), 154.4 (C_{Flu}), 151.1 (C(27)), 145.0 (C(24)), 142.4 (C_{Flu}), 137.7 (C(21)), 131.7 (C_{Flu}), 130.3 (C_{Flu}), 129.4 (C(19)), 125.9 (C(25)), 125.8 (C_{Flu}), 123.8 (C(20)), 120.9 (C(26)), 120.0 (C_{Flu}), 113.7 (C_{Flu}), 111.5 (C_{Flu}), 103.5 (C_{Flu}), 71.5, 71.4 (C(10), C(8)), 71.3, 71.1 (C(11), C(7)), 2x 70.3 (C(13), C(5)), 43.5 (C(3)), 38.9 (C(15)), 30.4 (C(14)), 29.9 (C(4)); **m/z**: 324 (11), 387 (7), 429 (100), 445 (32), 579 (7), 649 (6), 732 (9), 833 (7);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{44}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 859.28682,
 gefunden: 859.28756.



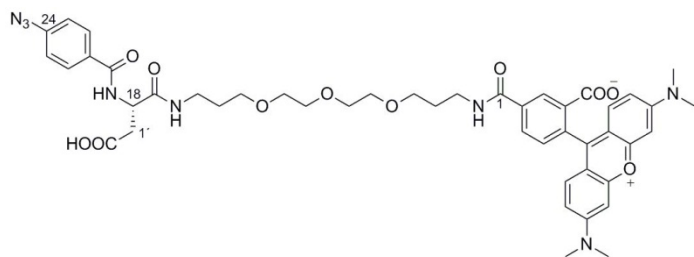
Amid 44: Zu einer 0 °C kalten Lösung von Amid **41** (6 mg, 8 μmol) in THF (2.0 ml) wurde Acetylchlorid (5 μl , 64 μmol) gegeben. Die

Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur kommen gelassen und über Nacht weiter unter Lichtausschluss gerührt. Es konnte kein Edukt mehr detektiert werden und weiterer Umsatz der Zwischenprodukte konnte auch nach weiteren 2 h nicht festgestellt werden (Methode: Kinetex, Produkt: 4.34 min). Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltenen Rückstand chromatographisch (20 \rightarrow 70% MeCN) gereinigt. Das acetylierte Produkt **44** wurde als schwach gelblich gefärbter, amorpher Feststoff zu 57 % (4 mg, 5 μmol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, **MeOD** δ : 7.98 (br. d, $J = 1.9$, 1H, $C(2')\text{-H}$), 7.83/7.13 (AA'/BB', $J = 8.8$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.70 (dd, $J = 1.9$, 8.1, 1H, $C(6')\text{-H}$), 7.30 (br. d, $J = 8.1$, 1H, $C(5')\text{-H}$), 7.20 (br. d, $J = 2.1$, 2H, $C(11')\text{-H}$), 6.93 (dd, $J = 2.2$, 8.7, 2H, $C(13')\text{-H}$), 6.70 (d, $J = 8.7$, 2H, $C(14')\text{-H}$), 3.67 – 3.64 (m, 4H, $C(10)H_2$, $C(8)H_2$), 3.63 – 3.59 (m, 4H, $C(11)H_2$, $C(7)H_2$), 3.58 (t, $J = 6.0$, 2H, $C(13)H_2$), 3.57 (t, $J = 6.0$, 2H, $C(5)H_2$), 3.46 (t, $J = 6.8$, 2H, $C(15)H_2$), 2.30 (s, 2H, 2x O-Ac), 2.11 (s, 3H, N-Ac), 1.96 (quint, $J = 6.3$, 2H, $C(4)H_2$), 1.87 (quint, $J = 6.4$, 2H, $C(14)H_2$); $^{13}\text{C-NMR}$, **MeOD** δ : 185.2 (C(1)), 174.0 (N-Ac), 170.5 (2x O-Ac), 169.1 (C(17)), 154.1 (C(12')), 153.7 (C(1')), 152.9 (C(10')), 145.1 (C(3')), 144.8 (C(18)), 138.1 (C(6')), 132.1 (C(21)), 130.2 (C(19)), 130.1 (2x C(14')), 128.5 (C(4')), 126.9 (C(2')), 126.0 (C(5')), 120.0 (C(20)), 119.5 (2x C(13')), 117.3 (C(9')), 111.6 (2x C(11')), 83.4 (C(8')), 71.6, 71.5 (C(10), C(8)), 71.4, 71.3 (C(11), 70.3, 70.1 (C(13), C(5)), 45.4 (C(3)), 38.8 (C(15)), 30.4 (C(14)),

28.8 (C(4)), 26.4 (N-Ac), 20.9 (2x O-Ac); **m/z**: 324 (25), 354 (7), 429 (100), 519 (10), 579 (13), 649 (13), 732 (15), 833 (11);

Exakte Masse: m/z für C₄₄H₄₄N₆O₁₂S [M-H]⁺ berechnet: 881.28107,
 gefunden: 881.28109.

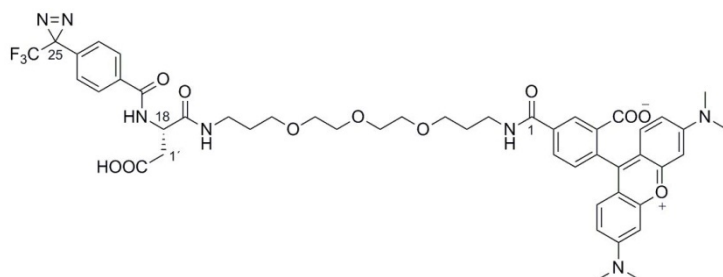


Scaffold 45: Zu einer Lösung von Amin **20** (28 mg, 47 µmol) und TEA (40 µl, 142 µmol) in THF (2.0 ml) wurde TAMRA-SE (5 mg, 10 µmol) gegeben und unter Lichtausschluss

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es konnte in der HPLC-MS noch beide Edukte detektiert werden und es wurde nochmals TEA (20 µl, 142 µmol) hinzugesetzt. Nach 30 min konnte vollständiger Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 7.64 min) detektiert werden. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels basischer MPLC (10 → 50 % MeOH) aufgereinigt. Das Scaffold **45** wurde als roter Feststoff zu 32 % (3 mg, 3 µmol) erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.54 (br. d, *J* = 1.7, 1H, *H*_{Rho}), 8.06 (dd, *J* = 1.8, 7.9, 1H, *H*_{Rho}), 7.88/7.11 (AA'/BB', *J* = 8.5, 4H, *H*_{arom.}), 7.36 (br. d, *J* = 7.9, 1H, *H*_{Rho}), 7.24 (s, 1H, *H*_{Rho}), 7.22 (s, 1H, *H*_{Rho}), 7.02 (br. d, *J* = 2.5, 1H, *H*_{Rho}), 7.00 (br. d, *J* = 2.5, 1H, *H*_{Rho}), 6.91 (br. t, *J* = 2.1, 2H, *H*_{Rho}), 4.81 (br. t, *J* = 6.5, 1H, C(18)-*H*), 3.67 – 3.52 (m, 10H, C(5)*H*₂ – C(11)*H*₂), 3.55 (t, *J* = 6.7, 2H, C(3)*H*₂), 3.49 (t, *J* = 6.2, 2H, C(13)*H*₂), 3.28 (s, 12H, 2x N-Me₂), 3.27 – 3.25 (m, 2H, C(15)*H*₂), 2.81 (dd, *J* = 6.1, 16.2, 1H, C(1')-*H*_a), 2.74 (dd, *J* = 7.3, 16.2, 1H, C(1')-*H*_b), 1.94 (quint, *J* = 6.4, 2H, C(4)*H*₂), 1.74 (quint, *J* = 6.3, 2H, C(14)*H*₂); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 173.5 (C(17)), 168.9 (C(1)), 168.7 (C(20)), 159.0 (C_{Rho}), 158.7 (C_{Rho}), 145.0 (C(21)), 141.4 (C_{Rho}), 137.3 (C_{Rho}), 137.0 (C_{Rho}), 132.6 (2x C_{Rho}), 131.6 (C(24)), 131.0 (C_{Rho}), 130.5 (C(22)), 129.7 (C_{Rho}), 129.6 (C_{Rho}), 120.0 (C(23)), 115.1 (2x C_{Rho}), 114.8 (2x C_{Rho}), 97.4 (2x C_{Rho}), 71.5 (C(8), C(10)), 71.3, 71.2 (C(7), C(11)), 70.2 (C(5)), 69.9 (C(13)), 52.7 (C(18)), 40.8 (4x Me), 38.8 (C(3)), 38.3 (C(1')), 38.0 (C(15)), 30.4 (C(4)), 30.2 (C(14)); **m/z**: 444 (100), 893 (4);

Exakte Masse: m/z für C₄₆H₅₂N₈O₁₁ [M-H]⁺ berechnet: 893.38283,
 gefunden: 893.38415.

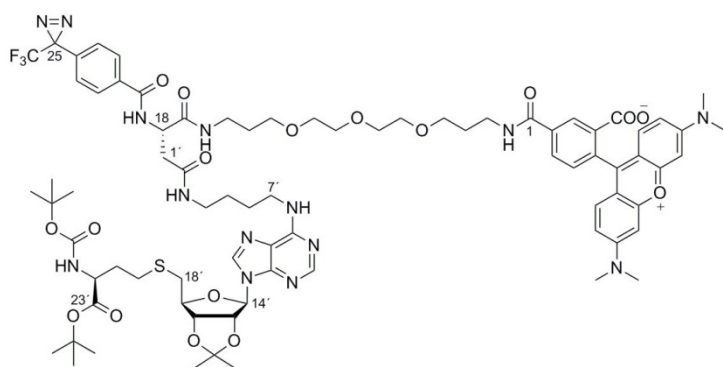


Scaffold 46: Zu einer Lösung von Amin **21** (13 mg, 19 μ mol) und TEA (20 μ l, 284 μ mol) in DMA (2.0 ml) wurde aktiviertes 4 Å Molsieb und TAMRA-SE (10 mg,

19 μ mol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend konnte vollständiger Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 9.04 min) detektiert werden. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels basischer MPLC (20 \rightarrow 60 % MeOH) aufgereinigt. Das Scaffold **46** wurde als roter Feststoff zu 31 % (6 mg, 6 μ mol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.53 (br. d, $J = 1.7$, 1H, H_{Rho}), 8.05 (dd, $J = 1.9$, 7.9, 1H, H_{Rho}), 7.95/7.32 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.35 (br. d, $J = 7.9$, 1H, H_{Rho}), 7.26 (s, 1H, H_{Rho}), 7.23 (s, 1H, H_{Rho}), 7.02 (dd, $J = 0.8$, 2.5, 1H, H_{Rho}), 7.00 (dd, $J = 0.8$, 2.5, 1H, H_{Rho}), 6.91 (br. t, $J = 2.2$, 2H, H_{Rho}), 4.75 (br. t, $J = 6.4$, 1H, C(18)-H), 3.66 – 3.53 (m, 10H, C(5) H_2 – C(11) H_2), 3.57 – 3.53 (m, 2H, C(3) H_2), 3.50 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.28 (s, 6H, N- Me_2), 3.27 (s, 6H, N- Me_2), 3.27 – 3.25 (m, 2H, C(15) H_2), 2.71 (dd, $J = 6.8$, 15.6, 1H, C(1')- H_a), 2.66 (dd, $J = 6.1$, 15.6, 1H, C(1')- H_b), 1.94 (quint, $J = 6.43$, 2H, C(14) H_2), 1.74 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(14) H_2); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 177.9 (C(2')), 174.1 (C(17)), 169.0 (C(1)), 168.3 (C(20)), 159.0 (C_{Rho}), 158.7 (C_{Rho}), 142.0 (C_{Rho}), 137.2 (C_{Rho}), 136.9 (C(24), (C_{Rho})), 133.2 (C(21)), 132.6 (2x C_{Rho}), 130.8 (C_{Rho}), 129.6 (C_{Rho}), 129.3 (C(22), C_{Rho}), 127.6 (C(23)), 123.5 (q, $J = 273$, C(26)), 115.0 (2x C_{Rho}), 114.8 (2x C_{Rho}), 97.4 (2x C_{Rho}), 71.5, 71.4 (C(8), C(10)), 71.3, 71.2 (C(7), C(11)), 70.2 (C(5)), 69.7 (C(13)), 53.5 (C(18)), 40.8 (4x Me), 40.3 (C(1')), 38.8 (C(3)), 37.8 (C(15)), 30.5 (C(4)), 30.3 (C(14)), 29.5 (q, $J = 41$, C(25)); **m/z:** 444 (47), 960 (100);

Exakte Masse: m/z für C₄₈H₅₂F₃N₇O₁₁ [M-H]⁺ berechnet: 960.37497,
gefunden: 960.37579.



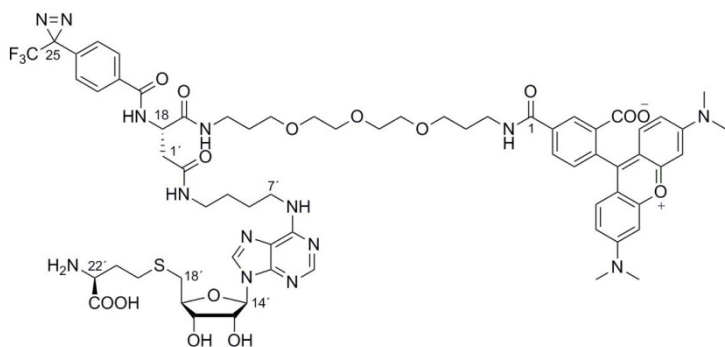
SAH-CC 47: Zu einer Lösung von Scaffold **46** (5 mg, 5 μ mol) und SAH **26** (4mg, 6 μ mol) in DMA (0.4 ml) wurde DIPEA (5 μ l, 26 μ mol) gegeben. Nach der Zugabe von HATU (2 mg, 6 μ mol) wurde die Reaktionslösung unter

Lichtausschluss bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend konnte vollständiger

Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 10.9 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des erhaltenen Rohproduktes erfolgte mittels basischer MPLC (30 → 70 % MeOH) und lieferte die SAH-CC **47** zu 96 % (8 mg, 5 µmol) als roten Feststoff.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.54 (d, $J = 1.6$, 1H, H_{Rho}), 8.22 (s, 1H, H_{Purin}), 8.19 (s, 1H, H_{Purin}), 8.05 (dd, $J = 1.8$, 7.9, 1H, H_{Rho}), 7.95/7.26 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.36 (d, $J = 7.9$, 1H, H_{Rho}), 7.24 (d, $J = 3.7$, 1H, H_{Rho}), 7.21 (d, $J = 6.0$, 1H, H_{Rho}), 6.99 (dd, $J = 2.5$, 9.5, 1H, H_{Rho}), 6.95 (dd, $J = 2.5$, 9.6, 1H, H_{Rho}), 6.89 – 6.87 (m, 2H, H_{Rho}), 6.16 (d, $J = 2.4$, 1H, C(14')-H), 5.49 (dd, $J = 2.1$, 6.2, 1H, C(15')-H), 5.06 (dd, $J = 2.9$, 6.2, 1H, C(16')-H), 4.84 (m, 1H, C(18)-H), 4.33 (m, 1H, C(17')-H), 4.09 (m, 1H, C(22')-H), 3.64 – 3.51 (m, 12H, C(3) H_2 , C(5) H_2 – C(11) H_2), 3.48 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.48 – 3.41 (m, 2H, C(7') H_2), 3.32 – 3.23 (m, 2H, C(15) H_2), 3.27 (s, 6H, N-Me₂), 3.26 (s, 6H, N-Me₂), 3.19 – 3.09 (m, 2H, C(4') H_2), 2.86 – 2.77 (m, 2H, C(18') H_2), 2.71 (dd, $J = 5.5$, 14.6, 1H, C(1')-H_a), 2.64 (dd, $J = 8.3$, 14.6, 1H, C(1')-H_b), 2.59 (m, 1H, C(20')-H_a), 2.52 (m, 1H, C(20')-H_b), 1.93 (m, 1H, C(21')-H_a), 1.93 (quint, $J = 6.3$, 2H, C(4) H_2), 1.81 (m, 1H, C(21')-H_b), 1.72 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(14) H_2), 1.63 – 1.56 (m, 2H, C(6') H_2), 1.59 (s, 3H, ⁱPr), 1.52 – 1.47 (m, 2H, C(5') H_2), 1.42 (s, 18H, 2x ^tBu), 1.39 (s, 3H, ⁱPr); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 172.9 (C(17)), 172.4 (C_{Rho}), 172.3 (C(2')), 169.0 (C(1)), 168.3 (C(20)), 159.0 (C_{Rho}), 158.7 (C_{Rho}), 158.6 (C_{Rho}), 154.1 (C_{Purin}), 142.2 (C_{Rho}), 141.2 (C_{Purin}), 137.2 (C_{Rho}), 136.8 (C_{Rho}), 136.5 (C(24)), 133.3 (C(21)), 132.6 (2x C_{Rho}), 130.9 (C_{Rho}), 129.6 (C_{Rho}), 129.5 (C_{Rho}), 129.4 (C(22)), 127.6 (C(23)), 123.4 (q, $J = 274$, C(26)), 115.5 (C(ⁱPr)), 115.0 (2x C_{Rho}), 114.8 (2x C_{Rho}), 97.4 (2x C_{Rho}), 91.5 (C(14')), 87.8 (C(17')), 85.2 (C(16')), 85.1 (C(15')), 82.7, 80.5 (2x C(^tBu)), 71.5 (C(8), C(10)), 71.3, 71.2 (C(7), C(11)), 70.2 (C(5)), 69.9 (C(13)), 54.6 (C(22')), 53.0 (C(18)), 40.9 (2x Me), 40.8 (2x Me), 40.1 (C(4')), 38.9 (C(3)), 38.7 (C(1')), 38.1 (C(15)), 34.9 (C(18')), 32.7 (C(21')), 30.4 (C(4)), 30.2 (C(14)), 29.5 (C(20')), 29.4 (q, $J = 40$, C(25)), 28.7, 28.3 (2x C(^tBu)), 27.6 (C(5'), C(6')), 27.4, 25.5 (2x C(ⁱPr)); **m/z:** 323 (8), 25 (18), 439 (64), 468 (8), 578 (15), 610 (22), 731 (20), 833 (20), 956 (14), 1109 (22), 1301 (26), 1549 (100);

Exakte Masse: m/z für C₇₈H₉₉F₃N₁₄O₁₇S [M-H]⁺ berechnet: 1593.70582,
 gefunden: 1593.70667.



SAH-CC 48: Die geschützte SAH-CC 47 (8 mg, 5 μmol) wurde in DCM (5.0 ml) gelöst, mit H_2O (2 μl , 125 μmol) und Thioanisol (15 μl , 125 μmol) versetzt und auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Nach Zugabe von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ kalter, 4M HCl in

Dioxan (125 μl , 502 μmol) wurde die Reaktionslösung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gerührt. Es wurde vollständiger Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 7.15 min) detektiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Eis/MeOH) entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mit TEA (1.0 ml) versetzt und erneut unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte mittels basischer MPLC (25 \rightarrow 45 % MeOH) und lieferte die SAH-CC 48 zu 46 % (3 mg, 2 μmol) als roten Feststoff.

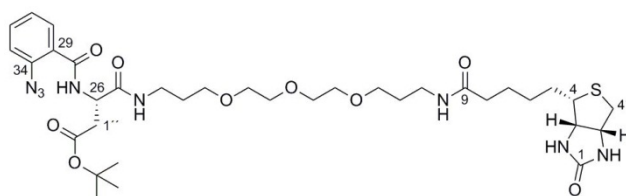
$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.54 (d, $J = 1.7$, 1H, H_{Rho}), 8.21 (s, 1H, H_{Purin}), 8.19 (s, 1H, H_{Purin}), 8.05 (dd, $J = 1.8$, 7.9, 1H, H_{Rho}), 7.95/7.27 (AA'/BB', $J = 8.3$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.36 (br. d, $J = 7.9$, 1H, H_{Rho}), 7.23 (d, $J = 3.4$, 1H, H_{Rho}), 7.21 (d, $J = 3.4$, 1H, H_{Rho}), 6.98 (dd, $J = 2.6$, 9.5, 1H, H_{Rho}), 6.95 (dd, $J = 2.5$, 7.2, 1H, H_{Rho}), 6.89 – 6.87 (m, 2H, H_{Rho}), 5.97 (d, $J = 5.0$, 1H, C(14')-H), 4.86 (m, 1H, C(18)-H), 4.74 (t, $J = 5.0$, 1H, C(15')-H), 4.31 (t, $J = 5.0$, 1H, C(16')-H), 4.19 (br. dd, $J = 5.9$, 10.8, 1H, C(17')-H), 3.65 – 3.48 (m, 11H, C(5) H_2 – C(11) H_2 , C(22')-H), 3.55 (t, $J = 6.5$, 1H, C(3) H_2), 3.47 (t, $J = 6.2$, 1H, C(13) H_2), 3.47 – 3.41 (m, 2H, C(7') H_2), 3.32 – 3.27 (m, 2H, C(15) H_2), 3.26 (s, 6H, N-Me $_2$), 3.25 (s, 6H, N-Me $_2$), 3.19 – 3.12 (m, 2H, C(4') H_2), 3.00 (dd, $J = 5.5$, 14.0, 1H, C(18')-H $_a$), 2.92 (dd, $J = 6.3$, 14.0, 1H, C(18')-H $_b$), 2.77 – 2.63 (m, 2H, C(20') H_2), 2.72 (dd, $J = 5.5$, 14.7, 1H, C(1')-H $_a$), 2.65 (dd, $J = 8.3$, 14.7, 1H, C(1')-H $_b$), 2.17 (m, 1H, C(21')-H $_a$), 2.00 (m, 1H, C(21')-H $_b$), 1.93 (quint, $J = 6.3$, 2H, C(4) H_2), 1.72 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(14) H_2), 1.63 – 1.56 (m, 2H, C(6') H_2), 1.53 – 1.46 (m, 2H, C(5') H_2); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 174.0 (C(23')), 172.9 (C(17)), 172.3 (C(2')), 169.0 (C(1)), 168.3 (C(20)), 159.9 (C $_{\text{Rho}}$), 158.7 (C $_{\text{Rho}}$), 154.0 (C $_{\text{Purin}}$), 142.1 (C $_{\text{Rho}}$), 140.6 (C $_{\text{Purin}}$), 137.2 (C $_{\text{Rho}}$), 136.8 (C $_{\text{Rho}}$), 136.5 (C(24)), 133.3 (C(21)), 132.6 (2x C $_{\text{Rho}}$), 130.9 (C $_{\text{Rho}}$), 129.6 (C $_{\text{Rho}}$), 129.5 (C $_{\text{Rho}}$), 129.4 (C(22)), 127.6 (C(23)), 115.1 (C $_{\text{Rho}}$), 115.0 (C $_{\text{Rho}}$), 114.8 (2x C $_{\text{Rho}}$), 97.3 (2x C $_{\text{Rho}}$), 89.9 (C(14')), 85.5 (C(17')), 75.0 (C(15')), 74.1 (C(16')), 71.5 (C(8), C(10)), 71.3, 71.2 (C(7), C(11)), 70.2 (C(5)), 69.9 (C(13)), 55.1 (C(22')), 53.0 (C(18)), 40.9 (2x Me), 40.8 (2x Me), 40.1 (C(4')), 38.9 (C(3)), 38.7 (C(1')), 38.2 (C(15)), 35.1 (C(18')), 32.5 (C(21')), 30.4 (C(4)), 30.2 (C(14)), 29.6m (C(20')), 27.6 (C(5'), C(6')); **m/z** [M-H] $^{2+}$: 236 (8), 317 (100), 383 (10), 458 (14);

4 Experimenteller Teil

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{66}\text{H}_{79}\text{F}_3\text{N}_{14}\text{O}_{15}\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ berechnet: 699.78695,
gefunden: 699.78635.

4.3.2 *o*- und *m*-Azido bzw. *m,m*-Bisazido-Scaffold & CCs

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 1) – Scaffoldsynthese: Das Open Scaffold **49** (1.0 Äquiv., 62 mg, 100 μ mol) und die Azidobenzoessäure (1.5 Äquiv.) wurden in DMA (3.3 ml) unter Argon gelöst. Zu der Lösung wurden DIPEA (2.5 Äquiv.) und HATU (1.1 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperaturgerührt bis per HPLC-MS kein Edukt mehr zu detektieren war. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC säulenchromatographisch gereinigt.

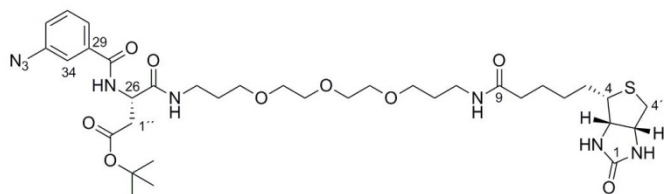


Scaffold 50: Nach AAV 1 mit Open Scaffold **49**, *o*-Azidobenzoessäure (25 mg, 150 μ mol), DIPEA (43 μ l, 250 μ mol) und HATU (42 mg, 110 μ mol). Nach 3 h

konnte kein Edukt mehr detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 8.9 min). Nach Aufreinigung (40 \rightarrow 80 % MeOH) wurde das Produkt **50** zu 90 % (71 mg, 93 μ mol) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 δ : 8.50 (d, $J = 8.1$, N(27)-H), 8.02 (dd, $J = 1.6, 7.8$, C(30)- $H_{\text{arom.}}$), 7.50 (dt, $J = 1.7, 7.8$, C(30)- $H_{\text{arom.}}$), 7.24 – 7.19 (m, 2H, C(31)- $H_{\text{arom.}}$, C(32)- $H_{\text{arom.}}$), 7.21 (m, 1H, N(24)-H), 6.82 (t, $J = 6.5$, N(10)-H), 6.39 (br. s, N(2)-H), 5.73 (br. s, 1H, N(2')-H), 4.98 (m, 1H, C(26)-H), 4.47 (dd, $J = 4.9, 7.7$, 1H, C(3')-H), 4.28 (dd, $J = 4.8, 7.6$, 1H, C(3)-H), 3.60 – 3.52 (m, 8H, C(15) H_2 – C(19) H_2), 3.52 (t, $J = 6.0$, 2H, C(13) H_2), 3.50 (t, $J = 6.0$, 2H, C(13) H_2), 3.35 (dt, $J = 3.0, 6.6$, 2H, C(23) H_2), 3.30 (br. q, $J = 6.1$, 2H, C(11) H_2), 3.10 (m, 1H, C(4)-H), 2.95 (dd, $J = 5.1, 16.7$, 1H, C(1'')- H_a), 2.87 (dd, $J = 4.9, 12.9$, 1H, C(4')- H_a), 2.72 (dd, $J = 6.4, 16.7$, 1H, C(1'')- H_b), 2.71 (d, $J = 12.9$, 1H, C(4')- H_b), 2.14 (t, $J = 7.5$, 2H, C(8) H_2), 1.79 – 1.70 (m, 4H, C(12) H_2 , C(22) H_2), 1.67 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.65 – 1.58 (m, 2H, C(7) H_2), 1.56 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.42 (s, 9H, ^tBu), 1.43 – 1.36 (m, 2H, C(6) H_2); **$^{13}\text{C-NMR}$, CDCl_3 δ :** 173.4 (C(9)), 171.0 (C(25)), 170.5 (C(2'')), 164.9 (C(28)), 164.1 (C(1)), 137.6 (C(29)), 132.8 (C(33)), 132.0 (C(30)), 125.2 (C(31)), 124.7 (C(34)), 118.7 (C(32)), 81.7 (C(^tBu)), 70.5, 70.4 (C(16), C(18)), 70.2, 70.1 (C(15), C(19)), 69.9, 69.2 (C(13), C(21)), 62.0 (C(3)), 60.3 (C(3')), 55.7 (C(4)), 50.3 (C(26)), 40.6 (C(4')), 37.7 (C(23)), 37.5 (C(11)), 37.5 (C(1'')), 36.0 (C(8)), 29.2, 29.0 (C(12), C(22)), 28.3 (C(6)), 28.1 (C(^tBu)), 28.1 (C(5)), 25.7 (C(7)); **m/z:** 429 (21), 440 (6), 513 (28), 583 (44), 675 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₅H₅₄N₈O₉S [M-H]⁺ berechnet: 763.38072,
gefunden: 763.38285.

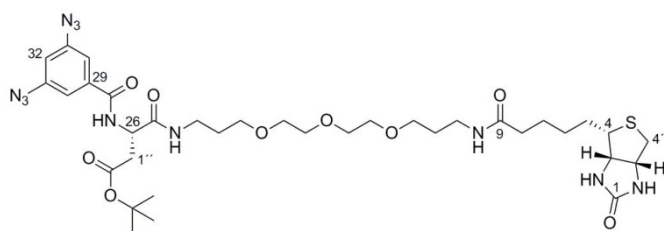


Scaffold 51: Nach AAV 1 mit Open Scaffold 49, *m*-Azidobenzoessäure (25 mg, 150 μmol), DIPEA (43 μl, 250 μmol) und HATU (42 mg,

110 μmol). Nach 3 h konnte kein Edukt mehr detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 8.9 min). Nach Aufreinigung (40 → 80 % MeOH) wurde das Produkt 51 zu 90 % (69 mg, 90 μmol) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 8.36 (d, *J* = 7.9, N(27)-*H*), 7.61 (br. dt, *J* = 1.1, 7.9, C(30)-*H*_{arom.}), 7.57 (br. t, *J* = 1.8, C(34)-*H*_{arom.}), 7.40 (t, *J* = 7.9, C(31)-*H*_{arom.}), 7.30 (t, *J* = 5.6, N(24)-*H*), 7.13 (ddd, *J* = 0.9, 2.3, 8.0, C(32)-*H*_{arom.}), 6.86 (br. t, *J* = 5.2, N(10)-*H*), 6.60 (br. s, 1H, N(2)-*H*), 5.40 (br. s, 1H, N(2')-*H*), 4.92 (br. dt, *J* = 6.6, 7.8, 1H, C(26)-*H*), 4.49 (dd, *J* = 4.8, 7.7, 1H, C(3')-*H*), 4.30 (dd, *J* = 4.6, 7.7, 1H, C(3)-*H*), 3.65 – 3.49 (m, 12H, 4H, C(13)*H*₂ – C(21)*H*₂), 3.44 – 3.24 (m, 4H, C(11)*H*₂, C(23)*H*₂), 3.10 (m, 1H, C(4)-*H*), 2.84 (dd, *J* = 5.0, 12.9, 1H, C(4')-*H*_a), 2.84 (br. d, *J* = 3.6, 1H, C(1'')-*H*_a), 2.82 (br. d, *J* = 4.2, 1H, C(1'')-*H*_b), 2.68 (d, *J* = 12.9, 1H, C(4')-*H*_b), 2.11 (t, *J* = 7.6, 2H, C(8)*H*₂), 1.79 – 1.73 (m, 4H, C(12)*H*₂, C(22)*H*₂), 1.67 – 1.58 (m, 2H, C(7)*H*₂), 1.63 (m, 1H, C(5)-*H*_a), 1.51 (m, 1H, C(5)-*H*_b), 1.42 (s, 9H, tBu), 1.41 – 1.33 (m, 2H, C(6)*H*₂); **¹³C-NMR, CDCl₃ δ:** 173.4 (C(9)), 171.1 (C(25)), 170.8 (C(2'')), 166.6 (C(28)), 164.0 (C(1)), 140.8 (C(33)), 135.4 (C(29)), 130.1 (C(31)), 123.8 (C(30)), 122.5 (C(32)), 118.4 (C(34)), 81.7 (C(tBu)), 70.6, 70.4 (C(16), C(18)), 70.2, 70.1 (C(15), C(19)), 69.9, 69.3 (C(13), C(21)), 62.1 (C(3)), 60.3 (C(3')), 55.7 (C(4)), 50.6 (C(26)), 40.7 (C(4')), 37.3 (C(23)), 37.6 (C(11)), 37.4 (C(1'')), 35.9 (C(8)), 29.1, 29.0 (C(12), C(22)), 28.2 (C(6)), 28.2 (C(tBu)), 28.1 (C(5)), 25.6 (C(7)); **m/z:** 439 (4), 513 (9), 583 (16), 675 (34), 763 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₅H₅₄N₈O₉S [M-H]⁺ berechnet: 763.38072,
gefunden: 763.38007.



Scaffold 52: Nach AAV 1 mit Open Scaffold 49, *m,m*-Bisazidobenzoessäure (31 mg, 150 μmol), DIPEA (43 μl, 250 μmol) und HATU (42 mg, 110 μmol). Nach 3 h konnte kein Edukt

mehr detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 9.9 min). Nach zweimaliger

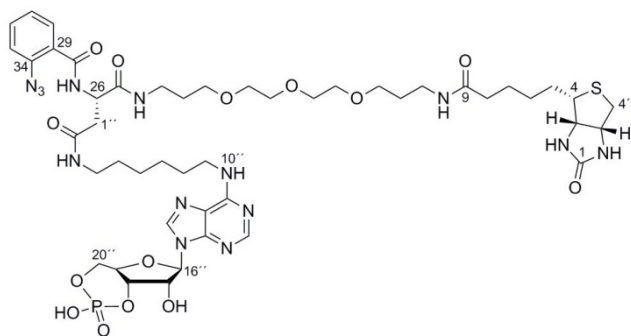
Aufreinigung (40 → 80 % MeOH, 55 → 70 % MeOH) wurde das Produkt **52** zu 12 % (10 mg, 12 µmol) als schwach gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.38 (d, $J = 2.0$, 1H, C(30)- $H_{\text{arom.}}$), 6.89 (t, $J = 2.0$, 1H, C(32)- $H_{\text{arom.}}$), 4.90 (dd, $J = 5.8, 8.7$, 1H, C(26)- H), 4.49 (ddd, $J = 0.7, 5.0, 7.9$, 1H, C(3')- H), 4.30 (dd, $J = 4.5, 7.8$, 1H, C(3)- H), 3.63 – 3.60 (m, 4H, C(15) H_2 , C(19) H_2), 3.59 – 3.55 (m, 4H, C(15) H_2 , C(19) H_2), 3.52 (t, $J = 6.1$, 2H, C(21) H_2), 3.51 (t, $J = 6.2$, 2H, C(21) H_2), 3.25 (t, $J = 6.7$, 2H, C(11) H_2), 3.32 – 3.29 (m, 2H, C(23) H_2), 3.20 (ddd, $J = 4.4, 5.6, 9.0$, 1H, C(4)- H), 2.92 (dd, $J = 5.0, 12.7$, 1H, C(4')- H_a), 2.90 (dd, $J = 5.8, 16.0$, 1H, C(1'')- H_a), 2.71 (dd, $J = 8.7, 16.1$, 1H, C(1'')- H_b), 2.70 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.19 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 1.80 – 1.72 (m, 4H, C(12) H_2 , C(22) H_2), 1.66 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.66 – 1.59 (m, 2H, C(7) H_2), 1.58 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.46 – 1.40 (m, 2H, C(6) H_2), 1.44 (s, 9H, tBu); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 175.9 (C(9)), 172.6 (C(25)), 171.4 (C(2'')), 167.9 (C(28)), 166.1 (C(1)), 143.8 (C(31)), 138.4 (C(29)), 115.7 (C(30)), 113.8 (C(32)), 82.4 (C(tBu)), 2x 71.5 (C(16), C(18)), 71.3, 71.2 (C(15), C(19)), 70.0 (C(21)), 69.9 (C(13)), 63.4 (C(3)), 61.7 (C(3')), 57.0 (C(4)), 52.3 (C(26)), 41.1 (C(4')), 38.4 (C(1'')), 38.2 (C(23)), 37.9 (C(11)), 36.9 (C(8)), 30.4 (C(22)), 30.2 (C(12)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.3 (C(tBu)), 26.9 (C(7)); **m/z:** 257 (6), 439 (16), 506 (5), 546 (15), 648 (5), 720 (13), 748 (100);

Exakte Masse: m/z für C ₃₅ H ₅₃ N ₁₁ O ₉ S [M-H] ⁺ berechnet:	804.38212,
gefunden:	804.38346.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV 2) - Spaltung des tert -Butylesters (a) und Synthese der Capture Compound (b) a: Der tert -Butylester (1.0 Äquiv.) wurde in DCM gelöst, mit TFA (30.0 Äquiv.) und H₂O (6.0 Äquiv.) versetzt. Unter Lichtausschluss wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt bis die per HPLC-MS vollständiger Umsatz detektiert wurde. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand am Hochvakuum getrocknet.

b: Die freie Säure wurde unter Argon in DMA erneut aufgenommen. Nach Zugabe von DIPEA (5.0 Äquiv.), cAMP **57** (1.1 Äquiv.) und HATU (1.1 Äquiv.) wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nachdem vollständigen Umsatz (HPLC-MS) detektiert wurde, wurde das Lösemittel am Hochvakuum und leichter Erwärmung (40 °C) entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC säulenchromatographisch gereinigt.

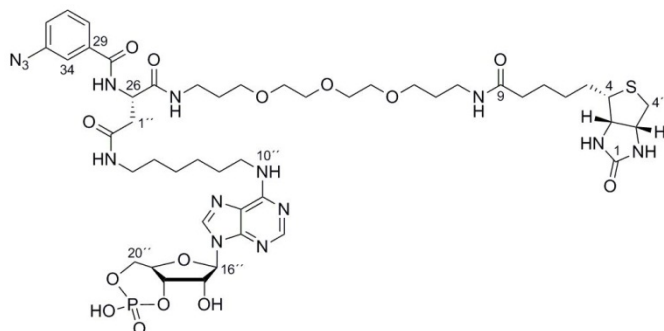


cAMP-CC 59: Nach **AAV 2a** wurde eine Lösung aus *tert*-Butylester **50** (57 mg, 75 μ mol), H₂O (8 μ l, 448 μ mol) und TFA (173 μ l, 2.2 mmol) in DCM (0.6 ml) über Nacht gerührt (Methode Screening: freie Säure: 5.72 min). Die Säure wurde nach

AAV 2b in DMA (2.6 ml) gelöst und mit DIPEA (68 μ l, 396 μ mol), cAMP **57** (37 mg, 87 μ mol) und HATU (33 mg, 87 μ mol) über Nacht gerührt (Methode: Screening, Produkt: 6.13 min). Nach dreimaliger MPLC (0 \rightarrow 40 % MeOH, 20 \rightarrow 50 % MeOH, 15 \rightarrow 25 % MeOH) wurde das Produkt **59** zu 19 % (17 mg, 15 μ mol) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR, DMSO δ : 8.54 (d, J = 7.9, 1H, N(27)-H), 8.37 (s, 1H, H_{Purin}), 8.25 (s, 1H, H_{Purin}), 8.02 (br. s, 1H, N(10'')-H), 7.90 (t, J = 5.6, 1H, N(3'')-H), 7.83 (t, J = 5.6, 1H, N(24)-H), 7.75 (t, J = 5.5, 1H, N(10)-H), 7.65 (dd, J = 1.5, 7.2, 1H, C(30)-H), 7.52 (dt, J = 1.6, 7.7, 1H, C(33)-H), 7.34 (br. d, J = 8.1, 1H, C(32)-H), 7.24 (dt, J = 0.9, 7.5, 1H, C(31)-H), 6.44 (s, 1H, N(2)-H), 6.38 (s, 1H, N(2')-H), 6.00 (s, 1H, C(16'')-H), 4.98 (br. s, 1H, C(18'')-H), 4.67 (m, 2H, C(26)-H, C(17'')-H), 4.45 (ddd, J = 4.5, 9.0, 21.3, 1H, C(20')- H_a), 4.30 (dd, J = 4.9, 7.7, 1H, C(3')-H), 4.21 (m, 1H, C(20')- H_b), 4.13 (m, 2H, C(3)-H, C(19'')-H), 3.49 – 3.46 (m, 4H, C(18) H_2 , C(16) H_2), 3.46 – 3.38 (m, 6H, C(19) H_2 , C(15) H_2 , C(9'') H_2), 3.37 (t, J = 6.3, 2H, C(21) H_2), 3.37 (t, J = 6.3, 2H, C(13) H_2), 3.13 – 2.98 (m, 5H, C(4'') H_2 , C(23) H_2 , C(4)H), 2.81 (dd, J = 5.0, 12.5, 1H, C(4')- H_a), 2.57 (d, J = 12.5, 1H, C(4')- H_b), 2.55 – 2.50 (m, 2H, C(1'')-H), 2.04 (t, J = 7.4, 2H, C(8) H_2), 1.64 – 1.56 (m, 4H, C(22) H_2 , C(12) H_2), 1.53 – 1.42 (m, 5H, C(7) H_2 , C(5)- H_b , C(8'') H_2), 1.50 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.37 – 1.32 (m, 2H, C(5'') H_2), 1.32 – 1.23 (m, 6H, C(6'') H_2 , C(7'') H_2 , C(6) H_2); **¹³C-NMR, DMSO δ :** 172.0 (C(9)), 170.4 (C(25)), 169.2 (C(2'')), 164.6 (C(28)), 162.8 (C(1)), 152.5 (C_{Purin}), 140.1 (C_{Purin}), 136.9 (C(29)), 132.0 (C(33)), 130.3 (C(30)), 124.9 (C(34)), 119.7 (C(32)), 92.0 (C(16'')), 77.8 (C(18'')), 71.6 (C(17'')), 71.0 (C(19'')), 2x 69.8 (C(16), C(18)), 2x 69.6 (C(15), C(19)), 2x 68.1 (C(13), C(21)), 68.0 (C(20'')), 61.1 (C(3)), 59.2 (C(3')), 55.5 (C(4)), 50.9 (C(26)), 2x 39.9 (C(4'), C(9'')), 38.6 (C(4'')), 37.6 (C(1')), 36.1 (C(23)), 35.8 (C(11)), 35.3 (C(8)), 30.0 (C(8'')), 29.4, 29.2 (C(12), C(22)), 29.1 (C(5'')), 28.2 (C(5)), 28.1 (C(6)), 26.2 (C(6''), C(7'')), 25.4 (C(7)); **m/z:** 447.3 (29), 661.3 (6), 877 (10), 895 (5), 1071 (66), 1089 (100);

Exakte Masse: m/z für C₄₇H₆₉N₁₄O₁₄PS [M-H]⁺ berechnet: 1117.46488,
 gefunden: 1117.46611.

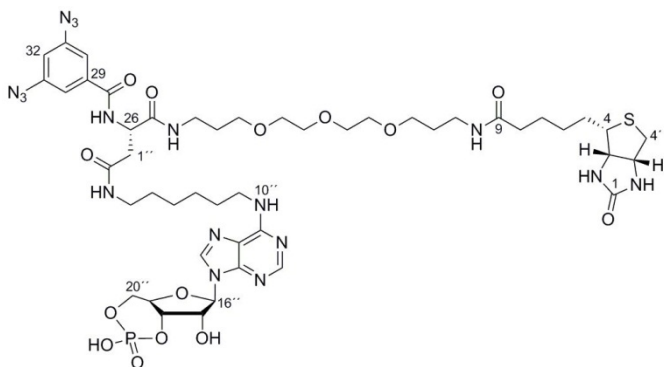


cAMP-CC 60: Nach **AAV 2a** wurde eine Lösung aus *tert*-Butylester **51** (57 mg, 75 μ mol), H₂O (8 μ l, 448 μ mol) und TFA (173 μ l, 2.2 mmol) in DCM (0.6 ml) über Nacht gerührt (Methode: Screening, freie Säure: 6.11 min). Die

Säure wurde nach **AAV 2b** in DMA (2.6 ml) gelöst, mit DIPEA (68 μ l, 396 μ mol), cAMP **57** (37 mg, 87 μ mol) und HATU (33 mg, 87 μ mol) über Nacht gerührt (Methode: Kinetex, Produkt: 6.35 min). Nach MPLC (0 \rightarrow 40 %, 40 \rightarrow 70 %, 2x 40 % MeOH, 20 \rightarrow 30 % MeCN) wurde das Produkt **60** zu 32 % (28 mg, 25 μ mol) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR, DMSO δ : 8.68 (d, J = 7.1, 1H, N(27)-H), 8.30 (s, 1H, H_{Purin}), 8.22 (s, 1H, H_{Purin}), 7.95 (br. s, 1H, N(24)-H), 7.85 (br. s, 1H, N(3'')-H), 7.78 (t, J = 5.4, 1H, N(10)-H), 7.67 (br. d, J = 7.7, 1H, C(30)- $H_{\text{arom.}}$), 7.57 (br. s, 1H, C(34)- $H_{\text{arom.}}$), 7.48 (t, J = 7.9, 1H, C(31)- $H_{\text{arom.}}$), 7.23 (dd, J = 1.5, 7.9, 1H, C(32)- $H_{\text{arom.}}$), 6.45 (s, 1H, N(2)-H), 6.39 (s, 1H, N(2')-H), 5.94 (s, 1H, C(16'')-H), 4.78 (br. s, 1H, C(18'')-H), 4.70 (m, 1H, C(26)-H), 4.59 (br. s, 1H, C(17'')-H), 4.30 (br. t, J = 6.1, 1H, C(3')-H), 4.20 (m, 1H, C(20'')- H_a), 4.12 (m, 1H, C(20'')- H_b), 4.11 (m, 1H, C(3)-H), 4.02 (m, 1H, C(19'')-H), 3.49 – 3.45 (m, 4H, C(18) H_2 , C(16) H_2), 3.45 – 3.41 (m, 6H, C(19) H_2 , C(15) H_2 , C(9'') H_2), 3.38 – 3.34 (m, 4H, C(21) H_2 , C(13) H_2), 3.12 – 3.03 (m, 5H, C(23) H_2 , C(11) H_2 , C(4)-H), 3.03 – 2.92 (m, 2H, C(4'') H_2), 2.80 (dd, J = 4.9, 12.3, 1H, C(4')- H_a), 2.59 – 2.56 (m, 2H, C(1'') H_2), 2.57 (d, J = 12.3, 1H, C(4')- H_b), 2.04 (t, J = 7.3, 2H, C(8) H_2), 1.65 – 1.56 (m, 4H, C(22) H_2 , C(12) H_2), 1.56 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.53 – 1.43 (m, 3H, C(7) H_2 , C(5)- H_b), 1.36 – 1.27 (m, 4H, C(5'') H_2 , C(8'') H_2), 1.25 – 1.17 (m, 6H, C(6'') H_2 , C(7'') H_2 , C(6) H_2); **¹³C-NMR, DMSO δ :** 172.0 (C(9)), 170.7 (C(25)), 169.2 (C(2'')), 165.1 (C(28)), 162.8 (C(1)), 154 (C_{Purin}), 152.9 (C_{Purin}), 148.0 (C_{Purin}), 2x 139.6 (C(33), C_{Purin}), 135.8 (C(29)), 130.0 (C(31)), 124.2 (C(30)), 121.9 (C(32)), 118.0 (C(34)), 91.7 (C(16'')), 77.3 (C(18'')), 2x 71.9 (C(17''), C(19'')), 2x 69.8 (C(18), C(16)), 2x 69.6 (C(19), C(15)), 2x 68.1 (C(21), C(13)), 66.3 (C(20'')), 61.1 (C(3)), 59.2 (C(3')), 55.5 (C(4)), 51.1 (C(26)), 2x 39.9 (C(4'), C(9'')), 38.5 (C(4'')), 37.6 (C(1'')), 36.1 (C(23)), 35.7 (C(11)), 35.2 (C(7)), 29.4, 29.2 (C(22), C(12)), 29.2 (C(5'')), 28.9 (C(8'')), 28.2 (C(5)), 28.1 (C(6)), 2x 26.2 (C(6''), C(7'')), 25.3 (C(7)); **m/z** [M-H]²⁺: 240 (16), 323 (25), 387 (14), 444 (39), 467 (27), 559 (100);

Exakte Masse: m/z für C₄₇H₆₉N₁₄O₁₄PS [M-H]⁺ berechnet: 1117.46488,
gefunden: 1117.45682.

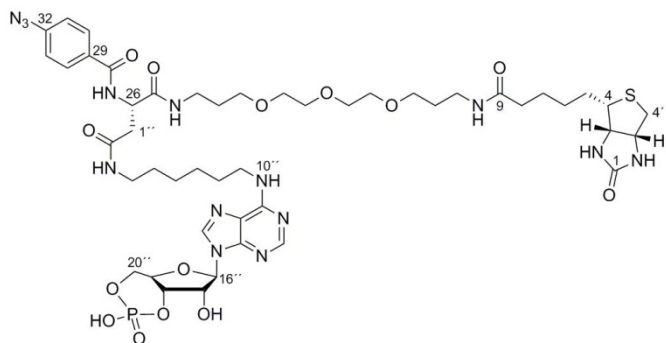


cAMP-CC 61: Nach **AAV 2a** wurde eine Lösung aus *tert*-Butylester **52** (10 mg, 12 μ mol), H₂O (1 μ l, 75 μ mol) und TFA (29 μ l, 373 μ mol) in DCM (0.5 ml) über Nacht gerührt (Methode: Screening, freie Säure: 6.97 min). Die Säure wurde nach **AAV 2b** in DMA

(0.4 ml) gelöst und mit DIPEA (11 μ l, 62 μ mol), cAMP **57** (6 mg, 14 μ mol) und HATU (5 mg, 14 μ mol) über Nacht gerührt (Methode: Screening, Produkt: 7.16 min). Nach MPLC (15 \rightarrow 40 % MeCN) wurde das Produkt **61** zu 83 % (12 mg, 10 μ mol) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR, DMSO δ : 8.35(s, 2H, H_{Purin}), 7.30 (d, $J = 2.0$, C(30)- $H_{\text{arom.}}$), 6.78 (t, $J = 2.0$, C(32)- $H_{\text{arom.}}$), 6.12 (s, 1H, C(16'')-H), 4.89 (m, 2H, C(26)-H, C(18'')-H), 4.67 (d, $J = 4.9$, 1H, C(17'')-H), 4.52 (br. dd, $J = 4.8, 7.8$ 1H, C(3')-H), 4.40 (m, 1H, C(20'')- H_a), 4.32 (dd, $J = 4.5, 7.9$, 1H, C(3)-H), 4.30 (m, 1H, C(19'')-H), 4.26 (dd, $J = 4.3, 10.3$, 1H, C(20'')- H_a), 3.63 – 3.56 (m, 8H, C(15) H_2 – C(19) H_2), 3.52 (t, $J = 6.3$, 2H, C(13) H_2), 3.52 (t, $J = 6.1$, 2H, C(21) H_2), 3.52 – 3.46 (m, 2H, C(9'') H_2), 3.31 – 3.28 (m, 2H, C(23) H_2), 3.24 (t, $J = 6.8$, 2H, C(11) H_2), 3.21 (m, 1H, C(4)-H), 3.17 – 3.10 (m, 2H, C(4'') H_2), 2.93 (dd, $J = 5.0, 12.9$ 1H, C(4')- H_a), 2.81 (dd, $J = 5.3, 14.7$, 1H, C(1'')- H_a), 2.71 (dd, $J = 9.0, 14.7$, 1H, C(1'')- H_b), 2.71 (d, $J = 12.9$ 1H, C(4')- H_b), 2.19 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 1.81 – 1.73 (m, 4H, C(12) H_2 , C(21) H_2), 1.71 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.67 – 1.58 (m, 4H, C(7) H_2 , C(8'') H_2), 1.54 – 1.46 (m, 3H, C(5)- H_b , C(5'') H_2), 1.44 – 1.28 (m, 6H, C(6) H_2 , C(6'') H_2 , C(7'') H_2); **¹³C-NMR, DMSO δ :** 176.4 (C(9)), 172.9 (C(25)), 172.2 (C(2'')), 168.0 (C(28)), 166.1 (C(1)), 149.2 (C_{Purin}), 143.7 (C(31)), 142.3 (C_{Purin}), 137.9 (C(29)), 115.5 (C(30)), 113.7 (C(32)), 93.6 (C(16'')), 78.8 (C(18'')), 74.1 (C(17'')), 73.6 (C(19'')), 2x 71.2 (C(16), C(18)), 2x 71.0 (C(15), C(19)), 69.9, 69.8 (C(13), C(21)), 68.2 (C(20'')), 63.3 (C(3)), 61.5 (C(3')), 56.9 (C(4)), 52.9 (C(26)), 42.6 (C(9'')), 41.0 (C(4')), 40.2 (C(4'')), 38.7 (C(1'')), 38.0 (C(23)), 37.7 (C(11)), 36.8 (C(8)), 2x 30.1 (C(22), C(5'')), 30.0 (C(12)), 2x 29.6 (C(6), C(8'')), 29.3 (C(5)), 2x 28.2 (C(6''), C(7'')), 26.8 (C(7)); **m/z:** 324 (18), 429 (50), 453 (26), 579 (6), 674 (8), 833 (7), 908 (25), 1102 (100);

Exakte Masse: m/z für C₄₇H₆₈N₁₇O₁₄PS [M-H]⁺ berechnet: 1158.46627,
gefunden: 1158.46768.



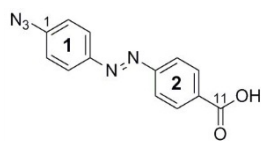
cAMP-CC 62: Nach **AAV 2a** wurde eine Lösung aus *tert*-Butylester **58** (85 mg, 109 μ mol), H_2O (12 μ l, 656 μ mol) und TFA (253 μ l, 3.3 mmol) in DCM (4.4 ml) über Nacht gerührt (Methode: Screening, freie Säure: 5.95 min). Die Säure wurde nach **AAV**

2b in DMA (3.6 ml) wieder aufgenommen. Von der Lösung wurden 1.8 ml abgenommen und für die weitere Reaktion mit DIPEA (48 μ l, 277 μ mol), cAMP **57** (26 mg, 61 μ mol) und HATU (23 mg, 61 μ mol) über Nacht gerührt (Methode: Screening, Produkt: 6.47 min). Nach zweifacher Reinigung mittels MPLC (0 \rightarrow 40 % MeOH, 18 \rightarrow 30 % MeCN) wurde das Produkt **62** zu 38 % (24 mg, 21 μ mol) als farbloser Feststoff erhalten.

1H -NMR, DMSO δ : 8.57 (d, $J = 7.5$, 1H, N(27)-H), 8.30 (s, 1H, H_{Purin}), 8.22 (s, 1H, H_{Purin}), 7.92 (br. s, 1H, N(24)-H), 7.91/7.18 (AA'/BB', $J = 8.5$, 4 $H_{arom.}$), 7.86 (br. s, 1H, N(3'')-H), 7.79 (t, $J = 5.4$, 1H, N(10)-H), 6.45 (s, 1H, N(2)-H), 6.39 (s, 1H, N(2')-H), 5.93 (s, 1H, C(16'')-H), 4.77 (br. s, 1H, C(18'')-H), 4.68 (dd, $J = 7.0, 7.3$, 1H, C(26)-H), 4.58 (d, $J = 4.9$, 1H, C(17'')-H), 4.30 (dd, $J = 5.1, 7.4$, 1H, C(3')-H), 4.21 (ddd, $J = 4.3, 8.5, 20.5$, 1H, C(20'')- H_a), 4.13 – 4.06 (m, 2H, C(3)-H, C(20'')- H_b), 4.00 (m, 1H, C(19'')-H), 3.49 – 3.40 (m, 10H, C(15) H_2 – C(19) H_2 , C(9'') H_2), 3.38 – 3.33 (m, 4H, C(21) H_2 , C(13) H_2), 3.11 – 3.01 (m, 7H, C(4)-H, C(11) H_2 , C(23) H_2 , C(4'') H_2), 2.81 (dd, $J = 5.0, 12.4$, 1H, C(4')- H_a), 2.57 (d, $J = 12.4$, 1H, C(4')- H_a), 2.56 – 2.50 (m, 2H, C(1'') H_2), 2.04 (t, $J = 7.3$, 2H, C(8) H_2), 1.63 – 1.55 (m, 4H, C(22) H_2 , C(12) H_2), 1.53 – 1.40 (m, 4H, C(7) H_2 , C(5)- H_2), 1.36 – 1.23 (m, 6H, C(6) H_2 , C(5'') H_2 , C(8'') H_2), 1.23 – 1.14 (m, 4H, C(6'') H_2 , C(7'') H_2); **^{13}C -NMR, DMSO δ :** 172.0 (C(9)), 170.9 (C(25)), 169.4 (C(2'')), 165.1 (C(28)), 162.8 (C(1)), 154.6 (C_{Purin}), 152.9 (C_{Purin}), 148.1 (C_{Purin}), 142.5 (C(29)), 139.6 (C_{Purin}), 130.6 (C(32)), 129.4 (C(30)), 119.5 (C_{Purin}), 118.8 (C(31)), 91.8 (C(16'')), 77.3 (C(18'')), 72.0 (C(17'')), 71.9 (C(19'')), 69.8, 69.7 (C(16), C(18)), 2x 69.6 (C(15), C(19)), 2x 68.1 (C(13), C(21)), 66.4 (C(20'')), 61.1 (C(3)), 59.3 (C(3')), 55.5 (C(4)), 51.1 (C(26)), 2x 39.9 (C(4'), C(9'')), 38.6 (C(4'')), 37.6 (C(1'')), 36.1 (C(23)), 35.8 (C(11)), 35.3 (C(8)), 29.4 (C(5'')), 29.3, 29.2 (C(12), C(22)), 29.0 (C(8'')), 28.3 (C(5)), 28.1 (C(6)), 2x 26.2 (C(6''), C(7'')), 25.4 (C(7)); **m/z:** 324 (23), 387 (10), 447 (46), 519 (9), 578 (18), 649 (9), 732 (16), 833 (12), 956 (19), 1089 (100);

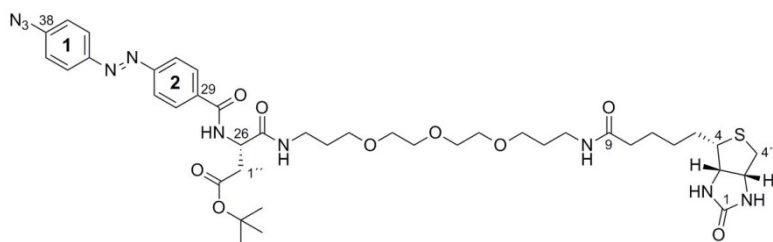
Exakte Masse: m/z für $C_{47}H_{69}N_{14}O_{14}PS$ [M-H] $^+$ berechnet: 1117.46488,
 gefunden: 1117.46486.

4.3.3 Spaltbare Reaktivitätsfunktionen



Azido-Azobenzoesäure 75: Zu einer 0 °C kalten Suspension von Aminosäure **74** (831 mg, 3.4 mmol) in 1M Essigsäure (8.0 ml) wurde *tert*-Butylnitrit (1.0ml, 7.6mmol) langsam hinzuge tropft und für weitere 100 min bei konstanter Temperatur gerührt. Nach der Zugabe von einer wässrigen Natriumazid-lsg. (1.1 g, 17.2 mmol in 2.6 ml) bei 0 °C innerhalb von 15 min wurde die Reaktionslösung noch für weitere 3 h bei konstanter Temperatur und unter Lichtausschluss gerührt. Der Umsatz betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 70 % (Methode: Kinetex, Produkt: 2.96 min) und die Lösung wurde über Nacht auf Raumtemperatur kommen gelassen. Anschließend betrug der Umsatz ca. 85 % und es wurde 6M HCl (10.0 ml) hinzugesetzt und der ausgefallene Feststoff abgesaugt, dreimal mit 6 M HCl (5.0 ml) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **75** wurde als rot-brauner pulverförmiger Feststoff zu 82% (754mg, 2.8mmol) erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.

¹H-NMR, DMSO δ : 13.21 (s, 1H, O(12)-H), 8.13-7.94 (2A2A'/2B2B', $J = 8.5$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.94/7.33 (1A1A'/1B1B', $J = 8.6$, 4H, $H_{\text{arom.}}$); **¹³C-NMR, DMSO δ :** 166.7 (C(11)), 154.3 (C(10)), 149.0 (C(1)), 143.3 (C(4)), 137.8 (C(7)), 130.7 (C(9)), 124.8 (C(3)), 122.5 (C(8)), 120.2 (C(2)); **Exakte Masse** und **MS-MS** waren aufgrund unzureichende Ionisierung nicht möglich.



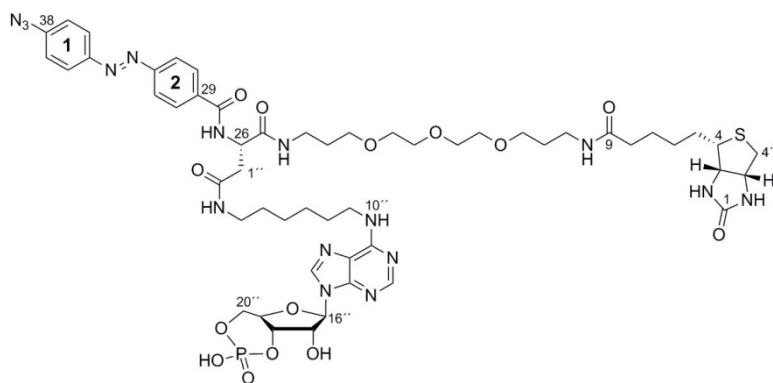
Scaffold 76: Zu einer Lösung von Open Scaffold (62 mg, 100 μ mol) und Azido-Azobenzoesäure **75** (40 mg, 150 μ mol) in DMA (3.0 ml)

wurde DIPEA (43 μ l, 250 μ mol) und HATU (42 mg, 110 μ mol) gegeben und die Reaktionslösung unter Lichtausschluss gerührt. Nach 2 h konnte kein Edukt mehr detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 11.0 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung (70 \rightarrow 100 % MeOH) des erhaltenen Rückstandes wurde das Produkt **76** zu 46 % (40 mg, 46 μ mol) als oranger amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ : 8.04-7.96 (2A2A'/2B2B', $J = 8.8$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.99/7.25 (1A1A'/1B1B', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.97 (dd, $J = 5.8$, 8.3, 1H, C(26)-H), 4.47 (ddd, $J = 0.7$, 4.9, 7.9, 1H, C(3')-H), 4.28 (dd, $J = 4.5$, 7.9, 1H, C(3)-H), 3.61 – 3.58 (m, 4H, C(16)H₂, C(18)H₂), 3.57 –

3.54 (m, 4H, C(15) H_2 , C(19) H_2), 3.53 (t, $J = 6.2$, 2H, C(21) H_2), 3.49 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.35 – 3.32 (m, 2H, C(23) H_2), 3.24 (t, $J = 6.8$, 2H, C(11) H_2), 3.17 (ddd, $J = 4.7$, 5.7, 9.0, 1H, C(4)- H), 2.93 (dd, $J = 5.8$, 16.0, 1H, C(1'')- H_a), 2.90 (dd, $J = 5.0$, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.75 (dd, $J = 8.4$, 16.0, 1H, C(1'')- H_b), 2.69 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.18 (t, $J = 7.5$, 2H, C(8) H_2), 1.78 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(22) H_2), 1.74 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(12) H_2), 1.67 – 1.54 (m, 4H, C(5) H_2 , C(7) H_2), 1.44 (s, 9H, t Bu), 1.43 – 1.37 (m, 2H, C(6) H_2); ^{13}C -NMR, MeOD δ : 175.9 (C(9)), 172.7 (C(25)), 171.5 (C(2'')), 169.0 (C(28)), 166.1 (C(1)), 155.8 (C(29)), 151.1 (C(38)), 145.1 (C(35)), 137.0 (C(32)), 129.8 (C(30)), 126.0 (C(36)), 123.7 (C(31)), 120.9 (C(37)), 82.4 (C(t Bu)), 71.5, 71.4 (C(16), C(18)), 2x 71.2 (C(15), C(19)), 2x 69.9 (C(13), C(21)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 52.2 (C(26)), 41.0 (C(4')), 38.5 (C(1'')), 38.2 (C(23)), 37.8 (C(11)), 36.9 (C(8)), 30.4 (C(22)), 30.2 (C(12)), 29.9 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.3 (C(t Bu)), 26.9 (C(7)); m/z : 417 (8), 509 (5), 617 (22), 675 (37), 687 (33), 745 (27), 867 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ berechnet: 867.41817,
gefunden: 867.41843.



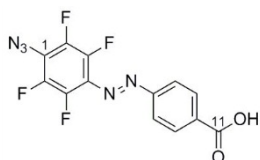
cAMP-CC 81: Zu einer Lösung von Scaffold 76 (40 mg, 46 μmol) in DCM (1.0 ml) wurde TFA (107 μl , 1.4 mmol) gegeben und die Reaktionslösung bei 35 ° C über Nacht gerührt. Anschließend konnte nur die

freie Carbonsäure detektiert werden (Methode: Screening, Produkt: 9.13 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (1.5 ml) aufgenommen und mit DIPEA (39 μl , 228 μmol) versetzt. Nach der Zugabe von cAMP 57 (21 mg, 49 μmol) und HATU (19 mg, 50 μmol) wurde die Lösung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Rühren über Nacht wurde vollständiger Umsatz (Methode: Screening, Produkt: 8.87 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach chromatographischer Reinigung des erhaltenen Rückstandes mittels MPLC (30 \rightarrow 60% MeOH) wurde das Produkt 81 zu 50 % (28 mg, 23 μmol) als oranger amorpher Rückstand isoliert.

^1H -NMR, DMSO δ : 8.72 (d, $J = 7.7$, 1H, N(27)- H), 8.35 (s, 1H, H_{Purin}), 8.22 (s, 1H, H_{Purin}), 8.07/7.94 (2A2A'/2B2B', $J = 8.8$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.96 (m, 1H, 1H, N(3'')- H), 7.96/7.32

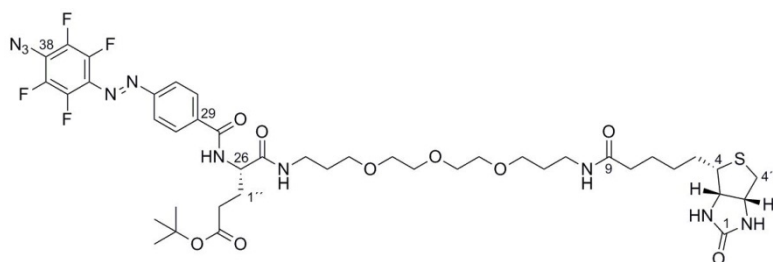
– 1.57 (m, 2H, C(7)H₂), 1.58 (m, 1H, C(5)-H_b), 1.40 (quint, $J = 7.6$, 2H, C(6)H₂); ¹³C-NMR, MeOD δ : 176.7 (C(3'')), 176.0 (C(9)), 173.8 (C(25)), 169.2 (C(28)), 166.1 (C(1)), 155.7 (C(29)), 151.1 (C(38)), 145.0 (C(35)), 137.0 (C(32)), 129.8 (C(30)), 126.0 (C(36)), 123.8 (C(31)), 120.9 (C(37)), 2x 71.5 (C(16), C(18)), 2x 71.2 (C(15), C(19)), 2x 70.0 (C(13), C(21)), 63.5 (C(3)), 61.7 (C(3')), 57.0 (C(4)), 55.1 (C(26)), 41.1 (C(4')), 38.1 (C(23)), 37.9 (C(11)), 36.9 (C(8)), 31.6 (C(2'')), 30.4 (C(12)), 30.3 (C(22)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.3 (C(1')), 26.9 (C(7)); m/z : 323 (16), 447 (100), 541 (6), 578 (5), 648 (5), 732 (5), 762 (18), 769 (72), 797 (11), 826 (28);

Exakte Masse: m/z für C₃₈H₅₂N₁₀O₉S [M-H]⁺ berechnet: 825.37177,
 gefunden: 825.37196.



Tetrafluor-Azido-Azobenzoessäure 84: Zu einer Suspension von Pentafluoranilin (612 mg, 3.3 mmol) in Wasser (100.0 ml) wurde *p*-Nitrosobenzoessäure (505 mg, 3.3 mmol) und NaOH (404 mg, 10.0 mmol) gegeben. Nach 3 h rühren bei Raumtemperatur wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 4.28 min) festgestellt und der ausgefallene Niederschlag wurde mittels Zentrifugation abgetrennt. Der erhaltene orange Feststoff wurde einmal mit Wasser gewaschen, zentrifugiert, am Hochvakuum getrocknet und in einem Aceton/Wasser-Gemisch (10.0 ml, 3:1) erneut aufgenommen. Nach der Zugabe von Natriumazid (114 mg, 1.7 mmol) wurde die Suspension für 1.5 d, über die sich die Suspension langsam aufklärte, bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurde das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und nach der Zugabe von Wasser (5.0 ml) erfolgte mit 0.5M HCl das Ansäuern der Reaktionslösung bis ca. pH = 3. Der dadurch ausgefallene orange-rote Niederschlag wurde erneut mittels Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit 0.5M HCl gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **84** wurde zu 45 % (506 mg, 1.5 mmol) als orange-roter Feststoff erhalten. Eine weitere Reinigung war nicht erforderlich.

¹H-NMR, DMSO δ : 13.36 (s, 1H, O(12)-H), 8.15-7.94 (AA'/BB', $J = 8.3$, 4H, $H_{\text{arom.}}$); ¹³C-NMR, DMSO δ : 166.5 (C(11)), 154.7 (C(10)), 141.9, 139.4 (C(1), C(4)), 134.2 (C(7)), 130.8 (C(9)), 122.7 (C(8)); **Exakte Masse** und **MS-MS** waren aufgrund unzureichende Ionisierung nicht möglich.

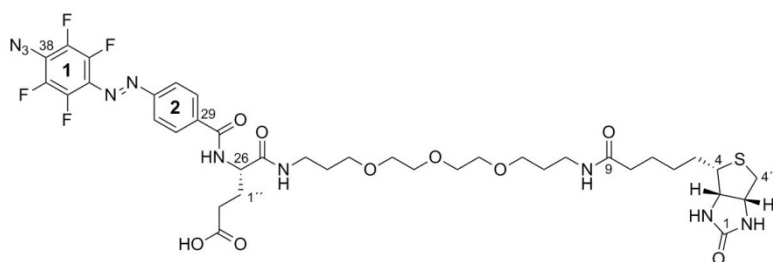


Scaffold 88: Zu einer Lösung von Open Scaffold **85** (466 mg, 737 μmol) und Tetrafluor-Azido-Azobenzoesäure **84** (250 mg, 737 μmol) in DMA

(10.0 ml) wurde DIPEA (126 μl , 737 μmol) und HATU (280 mg, 737 μmol) gegeben und die Reaktionslösung unter Lichtausschluss gerührt. Nach 1 h konnte kein Edukt mehr detektiert werden (Methode: Kinetex, Produkt: 4.15 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung (50 \rightarrow 90 % MeOH) des erhaltenen Rückstandes wurde das Produkt **88** zu 78 % (548 mg, 575 μmol) als oranger amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.08/7.98 (AA'/BB', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.56 (dd, $J = 5.4$, 9.1, 1H, C(26)-H), 4.48 (br. dd, $J = 5.0$, 7.8, 1H, C(3')-H), 4.29 (dd, $J = 4.5$, 7.8, 1H, C(3)-H), 3.64 – 4.61 (m, 4H, C(16) H_2 , C(18) H_2), 3.59 – 3.56 (m, 4H, C(15) H_2 , C(19) H_2), 3.55 (t, $J = 6.3$, 2H, C(21) H_2), 3.51 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.33 (t, $J = 6.7$, 2H, C(23) H_2), 3.25 (t, $J = 6.8$, 2H, C(11) H_2), 3.19 (ddd, $J = 4.7$, 5.7, 9.0, 1H, C(4)-H), 2.91 (dd, $J = 5.0$, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.42 (t, $J = 7.5$, 2H, C(2'') H_2), 2.19 (m, 1H, C(1'')- H_a), 2.18 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 2.07 (m, 1H, C(1'')- H_b), 1.80 (quint, $J = 6.4$, 2H, C(22) H_2), 1.75 (quint, $J = 6.5$, 2H, C(12) H_2), 1.73 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.69 – 1.61 (m, 2H, C(7) H_2), 1.59 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.46 – 1.40 (m, 2H, C(6) H_2), 1.45 (s, 9H, ^tBu); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 175.0 (C(9)), 174.0 (C(3'')), 173.7 (C(25)), 168.9 (C(28)), 166.1 (C(1)), 156.1 (C(29)), 138.6 (C(32)), 130.0 (C(30)), 124.0 (C(31)), 81.9 (C(^tBu)), 2x 71.5 (C(16), C(18)), 2x 71.2 (C(15), C(19)), 70.0 (C(13)), 69.9 (C(21)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 55.1 (C(26)), 41.0 (C(4')), 38.0 (C(23)), 37.8 (C(11)), 36.9 (C(8)), 32.9 (C(2'')), 30.4 (C(22)), 30.3 (C(12)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.4 (C(^tBu)), 28.3 (C(1'')), 26.9 (C(7)); **m/z:** 323 (4), 897 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{F}_4\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 953.39669,
gefunden: 953.39832.



Scaffold 90: Eine Lösung von Scaffold-*tert*-Butylester **88** (548 mg, 575 μmol) in DCM (20.0 ml) wurde mit TFA (4.5 ml, 58 mmol) versetzt und

bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 4.5 h wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.78 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (50 \rightarrow 90 %

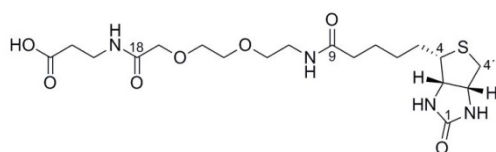
MeOH) aufgereinigt und das Produkt **90** zu 88 % (454 mg, 506 μ mol) als oranger amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ : 8.08/7.98 (AA'/BB', $J = 8.7$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.57 (dd, $J = 5.4$, 8.9, 1H, C(26)-H), 4.49 (ddd, $J = 0.7$, 5.0, 7.8, 1H, C(3')-H), 4.30 (dd, $J = 4.5$, 7.9, 1H, C(3)-H), 3.64 – 4.60 (m, 4H, C(16) H_2 , C(18) H_2), 3.60 – 3.56 (m, 4H, C(15) H_2 , C(19) H_2), 3.55 (t, $J = 6.2$, 2H, C(21) H_2), 3.51 (t, $J = 6.2$, 2H, C(13) H_2), 3.34 (t, $J = 6.6$, 2H, C(23) H_2), 3.25 (t, $J = 6.8$, 2H, C(11) H_2), 3.19 (ddd, $J = 4.6$, 5.5, 9.0, 1H, C(4)-H), 2.92 (dd, $J = 5.0$, 12.7, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, $J = 12.7$, 1H, C(4')- H_b), 2.49 (t, $J = 7.4$, 2H, C(2'') H_2), 2.21 (m, 1H, C(1'')- H_a), 2.19 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 2.12 (m, 1H, C(1'')- H_b), 1.80 (quint, $J = 6.5$, 2H, C(22) H_2), 1.75 (quint, $J = 6.6$, 2H, C(12) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.68 – 1.57 (m, 2H, C(7) H_2), 1.57 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.42 (quint, $J = 7.6$, 2H, C(6) H_2); **¹³C-NMR, MeOD δ :** 176.6 (C(3')), 176.0 (C(9)), 173.7 (C(25)), 169.0 (C(28)), 166.1 (C(1)), 156.1 (C(29)), 138.6 (C(32)), 130.0 (C(30)), 124.0 (C(31)), 2x 71.5 (C(16), C(18)), 2x 71.2 (C(15), C(19)), 70.0 (C(13)), 69.9 (C(21)), 63.4 (C(3)), 61.7 (C(3')), 57.0 (C(4)), 55.3 (C(26)), 41.0 (C(4')), 38.1 (C(23)), 37.9 (C(11)), 36.8 (C(8)), 31.5 (C(2'')), 30.4 (C(22)), 30.3 (C(12)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.3 (C(1'')), 26.9 (C(7)); **m/z:** 300 (14), 324 (72), 354 (22), 387 (21), 429 (54), 447 (100), 469 (68), 519 (16), 578 (20), 648 (34), 732 (22), 833 (22);

Exakte Masse: m/z für C ₃₈ H ₄₈ F ₄ N ₁₀ O ₉ S [M-H] ⁺ berechnet:	897.33353,
gefunden:	897.33425.

(ddd, $J = 4.6, 5.8, 9.0$, 1H, C(4)- H), 2.93 (dd, $J = 4.9, 12.8$, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, $J = 12.7$, 1H, C(4')- H_b), 2.48 (t, $J = 6.7$, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, $J = 7.3$, 2H, C(8) H_2), 1.73 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.69 – 1.63 (m, 2H, C(7) H_2), 1.60 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.48 – 1.39 (m, 2H, C(6) H_2), 1.46 (s, 9H, t Bu); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 172.8 (C(22)), 172.6 (C(18)), 166.1 (C(1)), 82.1 (C(t Bu)), 72.0 (C(15)), 71.3 (C(17)), 71.2 (C(14)), 70.7 (C(12)), 63.4 (C(3)), 61.0 (C(3')), 57.0 (C(4)), 41.0 (C(4')), 40.3 (C(11)), 36.7 (C(8)), 36.1 (C(21)), 35.9 (C(20)), 29.7 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.3 (C(t Bu)), 26.8 (C(7)); m/z : 461 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 517.26960,
gefunden: 517.27004.

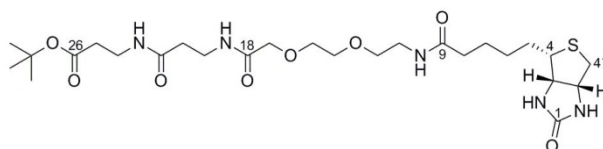


Biotin-Linker 96: Zu einer Lösung von *tert*-Butylester **95** (355 mg, 687 μmol) in DCM (50.0 ml) wurde TFA (5.3 ml, 68.7 mmol) gegeben. Nach

Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde vollständiger Umsatz detektiert (DC, MeOH/DCM - 1:5, $R_f = 0.53$) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die erhaltene freie Säure **96** wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 4.49 (br. dd, $J = 4.9, 7.9$, 1H, C(3')- H), 4.31 (dd, $J = 4.4, 7.9$, 1H, C(3)- H), 3.99 (s, 2H, C(17) H_2), 3.70 – 3.67 (m, 2H, C(15) H_2), 3.66 – 3.63 (m, 2H, C(14) H_2), 3.57 (t, $J = 5.5$, 2H, C(12) H_2), 3.50 (t, $J = 6.7$, 2H, C(20) H_2), 3.39 (t, $J = 5.5$, 2H, C(11) H_2), 3.21 (ddd, $J = 4.6, 5.8, 9.0$, 1H, C(4)- H), 2.93 (dd, $J = 5.0, 12.7$, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, $J = 12.7$, 1H, C(4')- H_b), 2.56 (t, $J = 6.7$, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, $J = 7.3$, 2H, C(8) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.69 – 1.64 (m, 2H, C(7) H_2), 1.60 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.48 – 1.39 (m, 2H, C(6) H_2); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 175.3 (C(22)), 172.7 (C(18)), 166.1 (C(1)), 72.0 (C(15)), 2x 71.2 (C(14), C(17)), 70.7 (C(12)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 41.0 (C(4')), 40.3 (C(11)), 36.7 (C(8)), 35.8 (C(20)), 34.6 (C(21)), 29.7 (C(6)), 29.5 (C(5)), 26.8 (C(7)); m/z : 227 (9), 270 (100), 425 (9), 443 (62);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 461.20700,
gefunden: 461.20652.



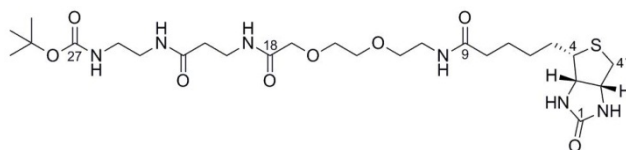
Biotin-Linker 98: Zu einer Lösung von Carbonsäure **96** (47 mg, 102 μmol), β -Alanin-*tert*-Butylester Hydrochlorid (20 mg,

110 μmol) und DIPEA (38 μl , 225 μmol) in DMA (4.0 ml) wurde HATU (39 mg, 103 μmol) gegeben. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.88 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem

Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (10 → 50% MeCN) gereinigt und das Produkt **98** zu 80 % (48 mg, 82 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 4.50 (ddd, $J = 0.7, 5.0, 7.9$, 1H, C(3')-H), 4.31 (dd, $J = 4.5, 7.9$, 1H, C(3)-H), 3.93 (s, 2H, C(17)H₂), 3.69 – 3.63 (m, 4H, C(14)H₂, C(15)H₂), 3.57 (t, $J = 5.4$, 2H, C(12)H₂), 3.53 – 3.48 (m, 2H, C(24)H₂), 3.42 – 3.36 (m, 4H, C(11)H₂, C(20)H₂), 3.21 (ddd, $J = 4.5, 5.8, 9.0$, 1H, C(4)-H), 2.93 (dd, $J = 5.0, 12.7$, 1H, C(4')-H_a), 2.71 (d, $J = 12.7$, 1H, C(4')-H_b), 2.45 (t, $J = 6.9$, 2H, C(21)H₂), 2.42 (t, $J = 6.7$, 2H, C(25)H₂), 2.24 (t, $J = 7.3$, 2H, C(8)H₂), 1.73 (m, 1H, C(5)-H_a), 1.72 – 1.61 (m, 2H, C(7)H₂), 1.62 (m, 1H, C(5)-H_b), 1.48 – 1.42 (m, 2H, C(6)H₂), 1.45 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.2 (C(9)), 173.6 (C(26)), 172.8 (C(18)), 172.6 (C(22)), 166.1 (C(1)), 81.9 (C(^tBu)), 72.0 (C(15)), 2x 71.2 (C(14), C(17)), 70.8 (C(12)), 63.3 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 41.1 (C(4')), 40.3 (C(11)), 36.7 (C(8)), 2x 36.5, 36.3, 36.1 (C(20), C(21), C(24), C(25)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 28.4 (C(^tBu)), 26.8 (C(7)); **m/z:** 532 (100);

Exakte Masse: m/z für C₂₆H₄₅N₅O₈S [M-H]⁺ berechnet: 588.30616,
gefunden: 588.30624.



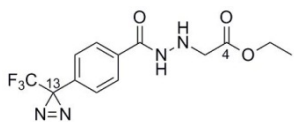
Biotin-Linker 97: Zu einer Lösung von Carbonsäure **96** (47 mg, 102 µmol), Boc-Ethylendiamin (18 mg, 112 µmol) und

DIPEA (19 µl, 112 µmol) in DMA (4.0 ml) wurde HATU (39 mg, 103 µmol) gegeben. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.75 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (10 → 50 % MeCN) gereinigt und das Produkt **97** zu 83 % (51 mg, 85 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 4.49 (ddd, $J = 0.8, 4.9, 7.9$, 1H, C(3')-H), 4.30 (dd, $J = 4.5, 7.9$, 1H, C(3)-H), 3.99 (s, 2H, C(17)H₂), 3.70 – 3.64 (m, 2H, C(14)H₂, C(15)H₂), 3.57 (t, $J = 5.4$, 2H, C(12)H₂), 3.24 (t, $J = 5.9$, 2H, C(24)H₂), 3.51 (t, $J = 6.7$, 2H, C(21)H₂), 3.43 (t, $J = 6.6$, 2H, C(20)H₂), 3.39 (t, $J = 5.4$, 2H, C(11)H₂), 3.21 (ddd, $J = 4.5, 5.8, 8.9$, 1H, C(4)-H), 3.17 – 3.13 (m, 2H, C(25)H₂), 2.93 (dd, $J = 5.0, 12.8$, 1H, C(4')-H_a), 2.71 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')-H_b), 2.24 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8)H₂), 1.72 (m, 1H, C(5)-H_a), 1.70 – 1.59 (m, 2H, C(7)H₂), 1.60 (m, 1H, C(5)-H_b), 1.46 – 1.41 (m, 2H, C(6)H₂), 1.44 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.2 (C(9)), 174.0 (C(22)), 172.8 (C(18)), 166.1 (C(1)), 158.6 (C(27)), 80.2 (C(^tBu)), 72.0 (C(15)), 2x 71.3 (C(14), C(17)), 70.8 (C(12)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 41.1 (C(4')), 40.9 (C(25)), 40.6 (C(24)), 40.3 (C(11)), 36.8 (C(8)), 2x 36.5 (C(20), C(21)), 29.8 (C(6)), 29.6 (C(5)), 28.8 (C(^tBu)), 26.9 (C(7)); **m/z:** 503 (100);

Exakte Masse: m/z für C₂₆H₄₆N₆O₈S [M-H]⁺ berechnet: 603.31706,
 gefunden: 603.31721.

Scaffold mit 1,4-Abstand

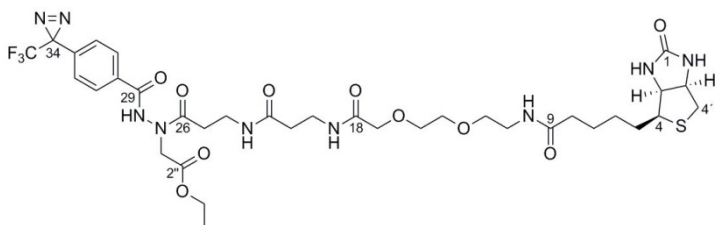


Amid 106: Zu einer Lösung von Benzoesäure **105** (100 mg, 435 μmol), Ethyl-2-hydrazinylacetat (103 mg, 869 μmol) und DIPEA (78 μl, 456 μmol) in DMA (5.0 ml) wurde HATU (173 mg,

456 μmol) gegeben. Nach rühren bei Raumtemperatur über Nacht konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (50 → 60% MeCN) gereinigt und das Produkt **106** zu 67 % (96 mg, 291 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.52 (br. s, 1H, N(7)-H), 7.79/7.23 (AA'/BB', J = 8.3, 4H, H_{arom.}), 5.11 (br. s, 1H, N(6)-H), 4.19 (q, J = 7.2, 2H, C(2)H₂), 3.75 (s, 2H, C(2)H₂), 1.26 (t, J = 7.2, 3H, C(1)H₃); ¹³C-NMR, MeOD δ: 171.2 (C(4)), 165.8 (C(8)), 132.8 (C(9)), 127.5 (C(10)), 126.7 (C(11)), 121.8 (q, J = 275, C(31)), 61.2 (C(2)), 52.4 (C(5)), 28.3 (q, J = 41, C(13)), 14.1 (C(1)); m/z: 229 (12), 303 (100);

Exakte Masse: m/z für C₁₃H₁₃F₃N₄O₃ [M-H]⁺ berechnet: 331.10180,
 gefunden: 331.10201.



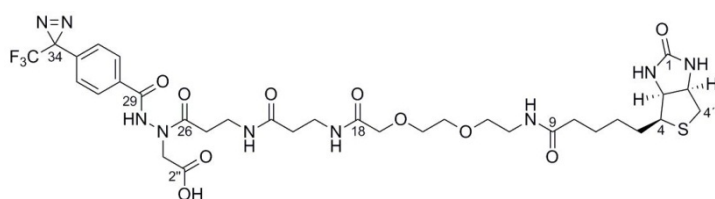
Scaffold 107: Zu einer Lösung von *tert*-Butylester **98** (46 mg, 78 μmol) in DCM (5.0 ml) wurde TFA (603 μl, 7.83 mmol) gegeben und

bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2.5 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 1.97 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und am Hochvakuum über Nacht getrocknet. Die erhaltene freie Säure wurde anschließend in DMA (4.0 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von DIPEA (67 μl, 391 μmol), Amin **106** (26 mg, 79 μmol) und HATU (33 mg, 87 μmol) wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.58 min) übers Wochenende gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC (40 → 60 % MeCN) gereinigt. Das Scaffold **107** wurde als farbloser, amorpher Feststoff zu 62 % (41 mg, 49 μmol) erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.98/7.40 (AA'/BB', J = 8.4, 4H, H_{arom.}), 4.49 (ddd, J = 0.8, 4.9, 7.9, 1H, C(3')-H), 4.30 (dd, J = 4.4, 7.9, 1H, C(3)-H), 4.21 (q, J = 7.2, 2H, C(4'')H₂), 3.96 (s, 2H,

C(17) H_2), 3.66 – 3.60 (m, 4H, C(14) H_2 , C(15) H_2), 3.54 (t, J = 5.4, 2H, C(12) H_2), 3.51 – 3.46 (m, 2H, C(20) H_2), 3.46 – 3.42 (m, 2H, C(24) H_2), 3.40 – 3.35 (m, 2H, C(11) H_2), 3.19 (ddd, J = 4.6, 5.7, 8.8, 1H, C(4)- H), 2.92 (dd, J = 5.0, 12.7, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, J = 12.7, 1H, C(4')- H_b), 2.65 (br. s, 2H, C(25) H_2), 2.40 (t, J = 6.9, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, J = 7.3, 2H, C(8) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.70 – 1.59 (m, 2H, C(7) H_2), 1.58 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.48 – 1.38 (m, 2H, C(6) H_2), 1.27 (t, J = 7.2, 3H, C(5'') H_3); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 175.2 (C(26)), 173.8 (C(22)), 172.7 (C(18)), 170.2 (C(2'')), 167.5 (C(29)), 166.1 (C(1)), 134.5 (C(33)), 134.2 (C(30)), 129.7 (C(31)), 127.9 (C(32)), 123.3 (q, J = 275, C(35)), 72.0 (C(15)), 2x 71.2 (C(14), C(17)), 70.7 (C(12)), 63.4 (C(3)), 62.5 (C(4'')), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 50.7 (C(1'')), 41.1 (C(4')), 40.3 (C(11)), 36.7 (C(8)), 2x 36.5, 36.2 (C(20), C(21), C(24)), 32.5 (C(25)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 29.5 (q, J = 41, C(34)), 26.8 (C(7)), 14.5 (C(5'')); m/z : 324 (38), 354 (9), 387 (9), 425 (9), 435 (100), 445 (43), 514 (8), 578 (11), 578 (13), 649 (14), 732 (15);

Exakte Masse: m/z für C₃₅H₄₈F₃N₉O₁₀S [M-H]⁺ berechnet: 844.32697,
gefunden: 844.32748.



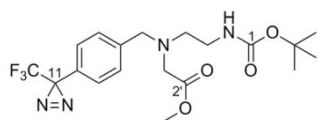
Scaffold 114: Zu einer Lösung von Scaffold **107** (7 mg, 8 μmol) in Wasser/THF (1:1, 2.0ml) wurde LiOH (2 mg, 84 μmol) gegeben und

unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach rühren über Nacht konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.30 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde nach der Zugabe von 1m wässriger HCl (83 μl , 83 μmol) unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 \rightarrow 60 % MeCN) gereinigt und das Scaffold 114 als farblose, amorphe Feststoff zu 81% (HABA-Avidin: 5.5 mg, 6.7 μmol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.99/7.40 (AA'/BB', J = 8.4, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.49 (ddd, J = 0.7, 4.9, 7.9, 1H, C(3')- H), 4.30 (dd, J = 4.4, 7.9, 1H, C(3)- H), 3.96 (s, 2H, C(17) H_2), 3.66 – 3.60 (m, 4H, C(14) H_2 , C(15) H_2), 3.54 (t, J = 5.4, 2H, C(12) H_2), 3.51 – 3.43 (m, 4H, C(20) H_2 , C(24) H_2), 3.37 (t, J = 5.4, 2H, C(11) H_2), 3.35 (s, 2H, C(1'') H_2), 3.19 (ddd, J = 4.5, 5.7, 8.9, 1H, C(4)- H), 2.92 (dd, J = 5.0, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, J = 12.8, 1H, C(4')- H_b), 2.65 (br. s, 2H, C(25) H_2), 2.40 (t, J = 6.5, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, J = 7.4, 2H, C(8) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.71 – 1.57 (m, 2H, C(7) H_2), 1.59 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.47 – 1.39 (m, 2H, C(6) H_2); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.3 (C(9)), 175.2 (C(26)), 173.8 (C(22)), 172.8 (C(18)), 172.2 (C(2'')), 167.7 (C(29)), 166.1 (C(1)), 134.5 (C(33)), 134.2 (C(30)), 129.7 (C(31)), 127.9 (C(32)), 123.4 (q, J

^tBu); ¹³C-NMR, CDCl₃ δ: 156.3 (C(1)), 141.9 (C(7)), 128.7 (C(9)), 128.0 (C(10)), 126.7 (C(8)), 123.3 (q, J = 274, C(12)), 79.5 (C(^tBu)), 53.0 (C(6)), 48.7 (C(4)), 40.3 (C(3)), 28.5 (C(^tBu)); m/z: 275 (15), 303 (100), 331 (3);

Exakte Masse: m/z für C₁₆H₂₁F₃N₄O₂ [M-H]⁺ berechnet: 359.16894,
gefunden: 359.16900.

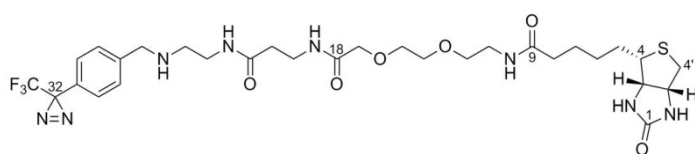


Amin 101: Zu einer Lösung von Amin **100** (21 mg, 59 μmol) in THF (2.0 ml) wurde Methylbromacetat (6 μl, 65 μmol) und DIPEA (10 μl, 59 μmol) gegeben und unter Lichtausschluss bei 45 °C

gerührt. Nach 2.5 d wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.93 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH - 10:1 → 5:1, R_F = 0.71 (20:1)) gereinigt und das Produkte **101** zu 67 % (17 mg, 39 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 7.36/7.14 (AA'/BB', J = 8.2, 4H, H_{arom.}), 5.09 (br. s, 1H, N(2)-H), 3.78 (s, 2H, C(6)H₂), 3.69 (s, 3H, C(4')H₃), 3.30 (s, 2H, C(1')H₂), 3.19 (dt, J = 5.0, 5.3, 2H, C(3)H₂), 2.74 (t, J = 5.8, 2H, C(4)H₂), 1.44 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-NMR, CDCl₃ δ: 171.9 (C(2')), 156.2 (C(1)), 140.8 (C(7)), 129.3 (C(8)), 128.3 (C(10)), 126.7 (C(9)), 122.3 (q, J = 274, C(12)), 79.3 (C(^tBu)), 58.0 (C(6)), 54.3 (C(1')), 53.7 (C(4)), 51.7 (C(4')), 38.4 (C(3)), 28.6 (C(^tBu)), 28.5 (q, J = 40, C(11)); m/z: 303 (5), 347 (37), 375 (100), 403 (10);

Exakte Masse: m/z für C₁₉H₂₅F₃N₄O₄ [M-H]⁺ berechnet: 431.19007,
gefunden: 431.18973.



Amid 104: a) Zu einer Lösung des geschützten Amins **100** (69 mg, 193 μmol) in DCM (5.0 ml) wurde

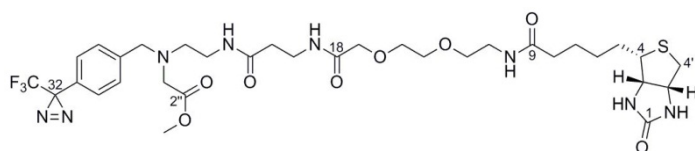
TFA (1.5 ml, 19.3 mmol) gegeben und für 90min bis zum vollständigem Umsatz (Methode: Kinetex, freies Amin: 1.93 min) gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene freie Amin **100a** so weiter umgesetzt.

b) Zu einer Lösung von *tert*-Butylester **95** (99 mg, 193 μmol) in DCM (5.0 ml) wurde TFA (1.5 ml, 19.3 mmol) gegeben und für 90 min bis zum vollständigem Umsatz (Methode: Kinetex, freie Säure: 2.02 min) gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene freie Säure **95a** so weiter umgesetzt. Die aus den Schritten a) und b) erhaltenen Substanzen **100a** und **95a** wurden zusammen in DMA (5.0 ml) gelöst und anschließend mit DIPEA (165 μl, 963 μmol) und HATU (81 mg, 212 μmol) versetzt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 1.5 h konnte

vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.83 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 → 70% MeCN) gereinigt und das Amid **104** zu 82 % (110 mg, 157 µmol) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.65/7.35 (AA'/BB', $J = 8.2$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.50 (br. dd, $J = 5.0$, 8.0, 1H, C(3')-H), 4.31 (dd, $J = 4.5$, 8.0, 1H, C(3)-H), 4.30 (s, 2H, C(27) H_2), 3.94 (s, 2H, C(17) H_2), 3.69 – 3.62 (m, 4H, C(14) H_2 , C(15) H_2), 3.56 (t, $J = 5.5$, 2H, C(12) H_2), 3.55 – 3.51 (m, 4H, C(20) H_2 , C(24) H_2), 3.37 (t, $J = 5.5$, 2H, C(11) H_2), 3.21 (t, $J = 5.4$, 2H, C(25) H_2), 3.21 (m, 1H, C(4)-H), 2.93 (dd, $J = 5.0$, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.70 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.41 (t, $J = 6.4$, 2H, C(21) H_2), 2.21 (t, $J = 7.4$, 2H, C(25) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.70 – 1.58 (m, 2H, C(7) H_2), 1.60 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.48 – 1.38 (m, 2H, C(6) H_2); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.2 (C(9)), 176.0 (C(22)), 173.2 (C(18)), 166.0 (C(1)), 134.8 (C(28)), 131.9 (C(29)), 131.2 (C(31)), 128.9 (C(30)), 123.4 (q, $J = 274$, C(33)), 71.9 (C(15)), 2x 71.2 (C(14), C(17)), 70.6 (C(12)), 3.3 (C(3)), 61.6 (C(3')), 56.9 (C(4)), 51.7 (C(27)), 49.8 (C(25)), 41.0 (C(4')), 40.2 (C(11)), 37.4 (C(21)), 37.1, 36.9 (C(20), C(24)), 36.7 (C(8)), 29.7 (C(6)), 29.5 (C(5)), 29.4 (q, $J = 41$, C(32)), 26.8 (C(7)); **m/z:** 324 (13), 429 (12), 541 (5), 655 (5), 673 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₀H₄₃F₃N₈O₆S [M-H]⁺ berechnet: 701.30511,
gefunden: 701.30610.



Amid 102: Methode A: Zu einer Lösung von Amin **101** (17 mg, 39 µmol) in DCM (2.0 ml) wurde TFA

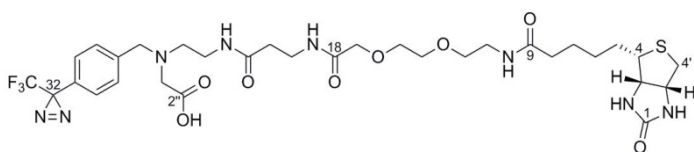
(0.5 ml, 6.4 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 90 min konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, freies Amin: 2.89 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde erneut in DMA (2.0 ml) aufgenommen und mit DIPEA (34 µl, 197 µmol) versetzt. Nach der Zugabe von Carbonsäure **96** (20 mg, 43 µmol) und HATU (17 mg, 44 µmol) wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.88 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 → 70 % MeCN) gereinigt und das Amid **102** zu 16 % (5 mg, 6 µmol) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

Methode B: Zu einer Lösung von Amin **104** (110 mg, 157 µmol) in THF (5.0 ml) wurde Methylbromacetat (16 µl, 173 µmol) und DIPEA (59 µl, 345 µmol) gegeben und unter Lichtausschluss bei 45 °C gerührt. Nach 20 h wurde annähernd vollständiger Umsatz

(Methode: Kinetex, Produkt: 3.42 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (40 → 60 % MeCN) gereinigt und das oben genannte Produkt **102** zu 58 % (70 mg, 91 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 7.65 (t, *J* = 6.0, 1H, N(19)-*H*), 7.37 (t, *J* = 2.3, 1H, N(10)-*H*), 7.33/7.15 (AA'/BB', *J* = 8.3, 4H, *H*_{arom.}), 7.08 (t, *J* = 4.5, 1H, N(23)-*H*), 5.99 (br. s, 1H, N(2)-*H*), 5.31 (br. s, 1H, N(2')-*H*), 4.49 (br. dd, *J* = 4.8, 7.7, 1H, C(3')-*H*), 4.31 (br. dd, *J* = 4.6, 7.2, 1H, C(3)-*H*), 3.97 (s, 2H, C(17)*H*₂), 3.75 (s, 2H, C(27)*H*₂), 3.68 (s, 3H, C(4'')*H*₃), 3.64 – 3.57 (m, 6H, C(14)*H*₂, C(15)*H*₂, C(20)*H*₂), 3.55 (t, *J* = 4.9, 2H, C(12)*H*₂), 3.30 – 3.26 (m, 2H, C(24)*H*₂), 3.26 (s, 2H, C(1'')*H*₂), 3.14 (m, 1H, C(4)-*H*), 2.90 (dd, *J* = 5.0, 12.9, 1H, C(4')-*H*_a), 2.75 (t, *J* = 5.4, 2H, C(25)*H*₂), 2.71 (d, *J* = 12.9, 1H, C(4')-*H*_b), 2.53 – 2.50 (m, 2H, C(21)*H*₂), 2.25 (t, *J* = 7.3, 2H, C(8)*H*₂), 1.73 (m, 1H, C(5)-*H*_a), 1.67 (quint, *J* = 7.3, 2H, C(7)*H*₂), 1.61 (m, 1H, C(5)-*H*_b), 1.44 (quint, *J* = 7.5, 2H, C(7)*H*₂); **¹³C-NMR, CDCl₃ δ:** 173.7 (C(9)), 172.4 (C(2'')), 171.9 (C(22)), 170.5 (C(18)), 163.8 (C(1)), 140.3 (C(28)), 129.2 (C(29)), 128.5 (C(31)), 126.8 (C(30)), 122.2 (q, *J* = 274, C(33)), 71.1 (C(15)), 70.6, 70.5 (C(14), C(17)), 70.2 (C(12)), 62.0 (C(3)), 60.3 (C(3')), 57.7 (C(27)), 55.5 (C(4)), 54.5 (C(1'')), 53.4 (C(25)), 52.0 (C(4'')), 40.7 (C(4')), 39.6 (C(11)), 37.6 (C(24)), 35.7 (C(8)), 35.5 (C(21)), 35.2 (C(20)), 28.5 (q, *J* = 41, C(32)), 28.2 (C(6)), 28.1 (C(5)), 25.7 (C(7)); **m/z:** 324 (16), 439 (5), 542 (7), 648 (15), 745 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₃H₄₇F₃N₈O₈S [M-H]⁺ berechnet: 773.32680,
 gefunden: 773.32650.



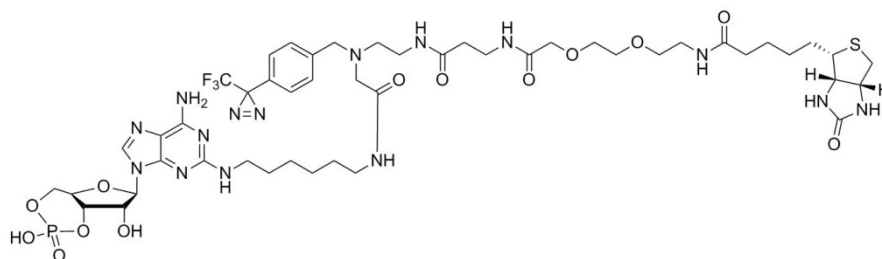
Scaffold 113: Zu einer Lösung von Methylester **102** (70 mg, 91 µmol) in THF/Wasser (2.0 ml, 1:1) wurde

LiOH (22 mg, 919 µmol) und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2.5 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.83 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde nach Zugabe von 2M wässriger HCl (460 µl, 919 µmol) unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 → 70 % MeCN) gereinigt und das Amid **113** zu 85 % (HABA-Avidin: 58.6 mg, 77 µmol) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.63/7.30 (AA'/BB', *J* = 8.2, 4H, *H*_{arom.}), 4.49 (br. dd, *J* = 5.0, 7.8, 1H, C(3')-*H*), 4.30 (dd, *J* = 4.4, 7.8, 1H, C(3)-*H*), 4.25 (s, 2H, C(27)*H*₂), 3.99 (s, 2H, C(17)*H*₂), 3.67 – 3.61 (m, 4H, C(14)*H*₂, C(15)*H*₂), 3.55 (t, *J* = 5.4, 2H, C(12)*H*₂), 3.52 (t, *J* = 6.6, 2H, C(20)*H*₂), 3.49 (s, 2H, C(1'')*H*₂), 3.47 (t, *J* = 5.8, 2H, C(24)*H*₂), 3.37 (t, *J* = 5.4, 2H, C(11)*H*₂),

3.20 (ddd, $J = 4.5, 5.8, 8.9$, 1H, C(4)- H), 3.10 (t, $J = 5.8$, 2H, C(25) H_2), 2.92 (dd, $J = 5.0, 12.8$, 1H, C(4')- H_a), 2.71 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.44 (t, $J = 6.6$, 2H, C(21) H_2), 2.22 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 1.72 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.64 (quint, $J = 7.4$, 2H, C(7) H_2), 1.59 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.48 – 1.40 (m, 2H, C(6) H_2); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 174.9 (C(22)), 172.8 (C(18)), 172.0 (C(2'')), 166.1 (C(1)), 137.5 (C(28)), 132.0 (C(29)), 130.4 (C(31)), 128.0 (C(30)), 123.5 (q, $J = 274$, C(33)), 72.0 (C(15)), 71.3, 71.2 (C(14), C(17)), 70.7 (C(12)), 63.3 (C(3)), 61.6 (C(3')), 58.4 (C(27)), 57.0 (C(4)), 56.1 (C(1'')), 55.8 (C(25)), 41.1 (C(4')), 40.3 (C(11)), 37.2 (C(24)), 36.7 (C(8)), 2x 36.5 (C(20), C(21)), 29.7 (C(6)), 29.5 (C(5)), 29.4 (q, $J = 41$, C(32)), 26.9 (C(7)); m/z : 324 (57), 354 (11), 387 (13), 429 (100), 445 (19), 519 (12), 541 (21), 578 (17), 649 (18), 731 (87);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 759.31059,
 gefunden: 759.31125.



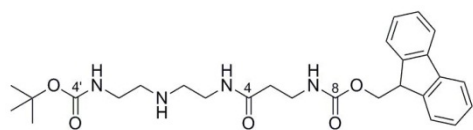
cAMP-CC 120: Zu einer Lösung von Scaffold **113** (5 mg, 6 μmol), cAMP **119** (3 mg, 7 μmol) und

DIPEA (1 μl , 7 μmol) in DMA (1.0 ml) wurde HATU (3 mg, 7 μmol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h wurde 50 %iger Umsatz (UV: 254 nm) detektiert und noch je 1 Äquiv. DIPEA und HATU hinzugesetzt. Nach weiteren 5 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.79 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (10 \rightarrow 50 % MeCN) gereinigt und die Capture Compound **120** zu 24 % (HABA-Avidin: 1.8 mg, 1.5 μmol) als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

m/z : 387 (10), 429 (46), 463 (91), 519 (7), 578 (14), 649 (10), 732 (11), 833 (7), 956 (8), 1109 (16), 1156 (100);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{48}\text{H}_{69}\text{F}_3\text{N}_{15}\text{O}_{13}\text{PS}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 1184.46825,
 gefunden: 1184.46942.

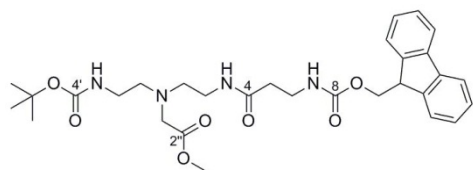
Scaffold mit 1,6-Abstand



Amid 109: Zu einer Lösung von Amin **108** (200 mg, 984 μmol) und Fmoc-geschütztem β -Alanin (337 mg, 1087 μmol) in DMA (20.0 ml) wurde DIPEA (185 μl , 1087 μmol) und HATU (412 mg, 1087 μmol) gegeben und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1 h wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.02 min) detektiert und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach MPLC-Reinigung (30 \rightarrow 70 % MeCN) des erhaltenen Rückstandes wurde das Produkt **109** zu 85 % (413 mg, 832 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.79 (d, $J = 7.5$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.64 (d, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.39 (t, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.31 (dt, $J = 1.0, 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 4.35 (d, $J = 6.9$, 2H, C(10) H_2), 4.19 (t, $J = 6.9$, 1H, C(11)-H), 3.46 (t, $J = 5.5$, 2H, C(2) H_2), 3.41 (t, $J = 6.3$, 2H, C(6) H_2), 3.34 (t, $J = 5.8$, 2H, C(2') H_2), 3.12 – 3.09 (m, 4H, C(1) H_2 , C(1') H_2), 2.39 (t, $J = 6.3$, 2H, C(5) H_2), 1.42 (s, 9H, ^tBu); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 176.1 (C(4)), 159.1 (C(8)), 158.9 (C(4')), 145.3 ($C_{\text{arom.}}$), 142.6 ($C_{\text{arom.}}$), 128.8 ($C_{\text{arom.}}$), 128.2 ($C_{\text{arom.}}$), 126.2 ($C_{\text{arom.}}$), 121.0 ($C_{\text{arom.}}$), 81.0 (C(^tBu)), 67.8 (C(10)), 2x 49.7 (C(1), C(1')), 48.4 (C(11)), 38.5 (C(6)), 38.1 (C(2')), 37.7 (C(5)), 37.2 (C(2)), 28.6 (C(^tBu)); **m/z:** 166 (100), 197 (36), 300 (8), 324 (24), 354 (7), 387 (8), 425 (8), 669 (7);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 597.27585,
gefunden: 597.27514.



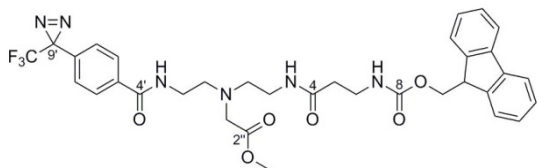
Amin 110: Zu einer Lösung von Amin **109** (413 mg, 832 μmol) in MeCN (50.0 ml) wurde DIPEA (157 μl , 915 μmol) und Methylbromacetat (84 μl , 915 μmol)

gegeben und bei 40 $^\circ\text{C}$ über Nacht gerührt. Es wurde ein Umsatz von ca. 60 % festgestellt und weitere 2 Äquiv. Methylbromacetat hinzugegeben. Nach weitere 6 h rühren betrug der Umsatz ca. 80 % und es wurde nach der Zugabe von weiteren 2 Äquiv. Methylbromacetat und DIPEA übers Wochenende weiter gerührt. Anschließend wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.34 min) detektiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) gereinigt und das Produkt **110** zu 53 % (251 mg, 441 μmol) als amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.78 (d, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.63 (d, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.38 (t, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.29 (t, $J = 7.4$, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 4.32 (d, $J = 6.9$, 2H, C(10) H_2), 4.18 (t, $J = 6.9$, 1H, C(11)-H), 3.65 (s, 3H, C(4'') H_3), 3.39 (s, 2H, C(1'') H_2), 3.39 (t, $J = 6.7$, 2H, C(6) H_2), 3.22 (t, $J = 6.1$, 2H, C(2) H_2), 3.06 (t, $J = 6.2$, 2H, C(2') H_2), 2.68 (t, $J = 6.1$, 2H, C(1) H_2), 2.66 (t, J

= 6.2, 2H, C(1')H₂), 2.42 (t, *J* = 6.7, 2H, C(5)H₂), 1.41 (s, 9H, ^tBu); ¹³C-NMR, MeOD δ: 174.0 (C(2'')), 173.7 (C(4)), 158.6 (C(8)), 158.4 (C(4')), 145.3 (C_{arom.}), 142.6 (C_{arom.}), 128.8 (C_{arom.}), 128.1 (C_{arom.}), 126.1 (C_{arom.}), 120.9 (C_{arom.}), 80.1 (C(^tBu)), 67.7 (C(10)), 55.9 (C(1'')), 54.9 (C(1')), 54.6 (C(1)), 52.1 (C(4'')), 48.4 (C(11)), 39.7 (C(2')), 38.6 (C(2)), 38.5 (C(6)), 37.3 (C(5)), 28.8 (C(^tBu)); **m/z**: 165 (10), 323 (7), 429 (5), 469 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₀H₄₀N₄O₇ [M-H]⁺ berechnet: 569.29753,
gefunden: 569.29730.

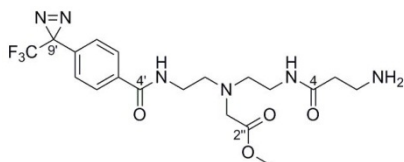


Amid 111: Eine Lösung von Amin **110** (125 mg, 220 μmol) in DCM (50.0 ml) wurde mit TFA (5 ml) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt.

Nach 30 min konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.72 min) festgestellt werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (10.0 ml) aufgenommen. Nach Zugabe von DIPEA (188 μl, 1.1 mmol), Diazirinbenzoesäure **105** (56 mg, 244 μmol) und HATU (93 mg, 244 μmol) wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach Rühren über Nacht wurde 75 % Umsatz festgestellt (Methode: Kinetex, Produkt: 3.62 min). Nach weitere Zugabe von 0.5 Äquiv. HATU und 1 Äquiv. DIPEA wurde noch weitere 6 h gerührt. Anschließend konnte das Amin nur noch in Spuren nachgewiesen werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufreinigung des erhaltenen Rückstandes mittels MPLC (50 → 90 % MeCN) wurde das Produkte **111** zu 70 % (104 mg, 153 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.89/7.28 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, H_{arom.}), 7.76 (d, *J* = 7.5, 2H, H_{arom.}), 7.59 (d, *J* = 7.5, 2H, H_{arom.}), 7.35 (t, *J* = 7.4, 2H, H_{arom.}), 7.26 (t, *J* = 7.4, 2H, H_{arom.}), 4.29 (d, *J* = 7.0, 2H, C(10)H₂), 4.15 (t, *J* = 7.0, 1H, C(11)-H), 3.63 (s, 3H, C(4'')H₃), 3.42 (s, 2H, C(1'')H₂), 3.41 (t, *J* = 6.2, 2H, C(2')H₂), 3.31 (t, *J* = 6.6, 2H, C(6)H₂), 3.22 (t, *J* = 6.1, 2H, C(2)H₂), 2.79 (t, *J* = 6.2, 2H, C(1')H₂), 2.71 (t, *J* = 6.1, 2H, C(1)H₂), 2.30 (t, *J* = 6.6, 2H, C(5)H₂); ¹³C-NMR, MeOD δ: 174.3 (C(2'')), 173.0 (C(4)), 168.7 (C(4')), 158.7 (C(8)), 145.3 (C_{arom.}), 142.6 (C_{arom.}), 137.1 (C(8')), 133.1 (C(5')), 129.1 (C(6')), 128.8 (C_{arom.}), 128.1 (C_{arom.}), 127.7 (C(7')), 126.2 (C_{arom.}), 123.5 (q, *J* = 273, C(10')), 121.0 (C_{arom.}), 67.8 (C(10)), 56.0 (C(1'')), 2x 54.6 (C(1), C(1')), 52.1 (C(4'')), 48.4 (C(11)), 39.5 (C(2')), 38.7 (C(2)), 38.5 (C(6)), 37.2 (C(5)), 29.5 (q, *J* = 40, C(9')); **m/z**: 337 (5), 450 (10), 556 (5), 653 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₄H₃₅F₃N₆O₆ [M-H]⁺ berechnet: 681.25702,
gefunden: 681.08810.

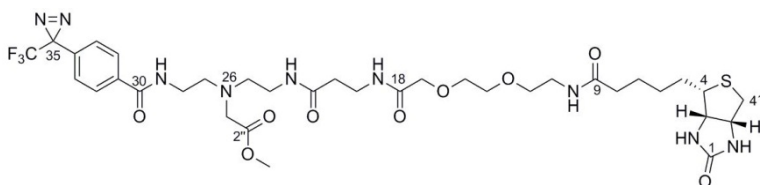


Amin 111': Eine Lösung des Fmoc-geschützten Amins **111** (104 mg, 153 μmol) in DCM/Piperidin (10.0 ml, 10:1) wurde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt.

Nach 1 h konnte wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.12 min) detektiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in MeCN suspendiert und der Feststoff abgesaugt und 3x mit MECN gewaschen. Das Filtrat wurde erneut unter vermindertem Druck eingeeengt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC (20 \rightarrow 60 % MeCN) gereinigt. Das oben genannte Produkt **111'** wurde als farbloses Öl zu 86 % (60 mg, 131 μmol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.95/7.34 (AA'/BB', $J = 8.3$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 3.68 (s, 3H, C(4'') H_3), 3.49 (s, 2H, C(1'') H_2), 3.44 (t, $J = 6.0$, 2H, C(2'') H_2), 3.25 (t, $J = 6.2$, 2H, C(2) H_2), 2.84 (t, $J = 6.0$, 2H, C(1') H_2), 2.75 (t, $J = 6.2$, 2H, C(1) H_2), 2.65 (t, $J = 6.8$, 2H, C(6) H_2), 2.24 (t, $J = 6.8$, 2H, C(5) H_2); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 174.5 (C(4)), 174.2 (C(2'')), 168.7 (C(4')), 137.3 (C(8')), 133.1 (C(5')), 129.1 (C(6')), 127.7 (C(7')), 123.4 (q, $J = 274$, C(10')), 56.0 (C(1'')), 54.6 (C(1')), 54.5 (C(1)), 52.2 (C(4'')), 51.7 (C(6)), 39.8 (C(2'')), 38.7 (C(2)), 35.1 (C(5)), 29.4 (q, $J = 41$, C(9')); **m/z:** 228 (36), 257 (99), 299 (11), 317 (23), 346 (100), 413 (43), 431 (40);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 459.19677,
gefunden: 459.19606.



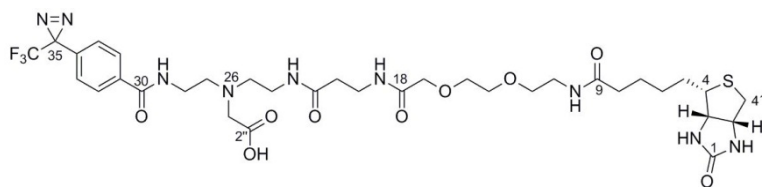
Scaffold 112: Zu einer Lösung von Amin **111'** (50 mg, 109 μmol) und Carbonsäure **94** (47 mg, 121 μmol) in DMA

(10.0 ml) wurde DIPEA (37 μl , 218 μmol) und HATU (46 mg, 121 μmol) gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Anschließend konnten noch beide Edukte detektiert werden und es wurde noch je 1 Äquiv. DIPEA und HATU hinzugegeben. Nach weiteren 3 h rühren konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.61 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 \rightarrow 70 % MeCN) gereinigt, jedoch konnte das genannte Produkt **112** nur mit einer Reinheit von max. 70 % erhalten werden und wurde so für die anschließende Methylesterspaltung eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 7.95/7.36 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.49 (br. dd, $J = 5.0$, 7.9, 1H, C(3')-H), 4.30 (dd, $J = 4.5$, 7.9, 1H, C(3)-H), 3.97 (s, 2H, C(17) H_2), 3.69 (s, 3H, C(4'') H_3), 3.68 – 3.62 (m, 4H, C(14) H_2 , C(15) H_2), 3.55 (t, $J = 5.4$, 2H, C(12) H_2), 3.50 (s, 2H, C(1'') H_2), 3.45 (t, $J = 6.0$, 2H, C(28) H_2), 3.44 (t, $J = 6.6$, 2H, C(20) H_2), 3.37 (t, $J = 5.4$, 2H, C(11) H_2),

3.25 (t, $J = 6.1$, 2H, C(24) H_2), 3.20 (m, 1H, C(4)- H), 2.92 (dd, $J = 5.1$, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.86 (t, $J = 6.1$, 2H, C(27) H_2), 2.76 (t, $J = 6.1$, 2H, C(25) H_2), 2.70 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.34 (t, $J = 6.6$, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 1.74 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.70 – 1.60 (m, 2H, C(7) H_2), 1.58 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.43 (quint, $J = 7.6$, 2H, C(6) H_2); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 174.3 (C(2'')), 173.6 (C(22)), 172.7 (C(18)), 168.7 (C(30)), 166.1 (C(1)), 137.2 (C(34)), 133.1 (C(31)), 129.1 (C(32)), 127.7 (C(33)), 123.5 (q, $J = 123.5$, C(36)), 72.0 (C(15)), 2x 71.2 (C(14), C(17)), 70.7 (C(12)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 56.0 (C(1'')), 54.6 (C(27)), 54.5 (C(25)), 52.2 (C(4'')), 41.1 (C(4')), 40.3 (C(11)), 39.5 (C(28)), 38.8 (C(24)), 36.7 (C(8)), 2x 36.4 (C(20), C(21)), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 29.4 (q, $J = 41$, C(35)), 26.8 (C(7)); m/z: 323 (14), 444 (5), 648 (6), 802 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₅H₅₀F₃N₉O₉S [M-H]⁺ berechnet: 830.34826,
gefunden: 830.34825.



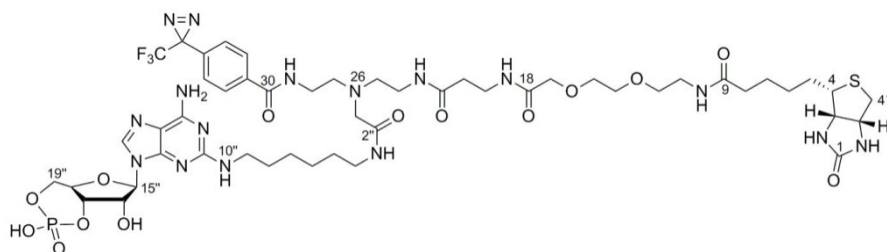
Scaffold 115: Zu einer Lösung von Methylester **112** (23 mg, 28 μmol) in einem Gemisch aus THF u. Wasser (15.0 ml, 2:1)

wurde LiOH (3 mg, 126 μmol) und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Rühren über Nacht konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.44 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde nach Zugabe von 1M wässriger HCl (139 μl , 139 μmol) unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 \rightarrow 60 % MeCN) gereinigt und die freie Säure **115** zu 97 % (22 mg, 27 μmol) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 8.01/7.36 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.50 (br. dd, $J = 4.8$, 7.7, 1H, C(3')-H), 4.31 (dd, $J = 4.6$, 7.8, 1H, C(3)-H), 4.04 (s, 2H, C(1'') H_2), 3.97 (s, 2H, C(17) H_2), 3.81 – 3.77 (m, 2H, C(28) H_2), 3.68 – 3.62 (m, 4H, C(14) H_2 , C(15) H_2), 3.60 – 3.56 (m, 2H, C(25) H_2), 3.56 (t, $J = 5.4$, 2H, C(12) H_2), 3.55 – 3.52 (m, 2H, C(27) H_2), 3.45 (t, $J = 6.3$, 2H, C(24) H_2), 3.43 (t, $J = 6.3$, 2H, C(20) H_2), 3.38 (t, $J = 5.4$, 2H, C(11) H_2), 3.20 (m, 1H, C(4)-H), 2.93 (dd, $J = 4.9$, 12.8, 1H, C(4')- H_a), 2.71 (d, $J = 12.8$, 1H, C(4')- H_b), 2.45 (t, $J = 6.4$, 2H, C(21) H_2), 2.23 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8) H_2), 1.75 (m, 1H, C(5)- H_a), 1.71 – 1.59 (m, 2H, C(7) H_2), 1.57 (m, 1H, C(5)- H_b), 1.43 (quint, $J = 7.6$, 2H, C(6) H_2); $^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ : 176.2 (C(9)), 175.6 (C(22)), 172.8 (C(18)), 169.9 (C(2'')), 169.8 (C(30)), 166.1 (C(1)), 136.5 (C(34)), 133.3 (C(31)), 129.4 (C(32)), 127.7 (C(33)), 72.0 (C(15)), 71.3 (C(14)), 71.2 (C(17)), 70.6 (C(12)), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 57.0 (C(4)), 56.3 (C(27)), 2x 56.1 (C(1''), C(25)), 41.1 (C(4')), 40.3

(C(11)), 36.8 (C(28)), 36.7 (C(8)), 36.4 (C(24)), 36.5 (C(21)), 36.3 (C(20)), 29.7 (C(6)), 29.5 (C(5)), 26.8 (C(7)); **m/z**: 324 (11), 444 (100);

Exakte Masse: m/z für C₃₄H₄₈F₃N₉O₉S [M-H]⁺ berechnet: 816.33206,
gefunden: 816.33305.



cAMP-CC 122: Zu einer Lösung von Scaffold **115** (15 mg, 18 µmol), cAMP **119** (9 mg, 20 µmol) und

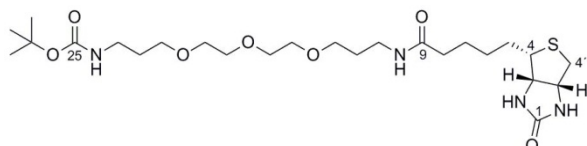
DIPEA (4 µl, 23 µmol) in DMA (1.0 ml) wurde HATU (8 mg, 23 µmol) gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach Rühren über Nacht konnten noch beiden Edukte (UV: 254 nm) detektiert werden und es wurde je 0.5 Äquiv. DIPEA und HATU hinzugesetzt. Nach weiteren 4 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.30 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (10 → 60 % MeCN) gereinigt und die Capture Compound **122** zu 35 % (8 mg, 6 µmol) als leicht beiger, amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 8.01/7.36 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.}), 7.95 (s, 1H, *H*_{Purin}), 5.87 (s, 1H, C(15'')-H), 5.04 (br. s, 1H, C(17'')-H), 4.75 (d, *J* = 4.8, 1H, C(16'')-H), 4.48 (br. dt, *J* = 4.9, 7.9, 1H, C(3')-H), 4.35 (ddd, *J* = 4.4, 8.7, 20.6, 1H, C(19'')-H_a), 4.29 (dd, *J* = 4.4, 7.8, 1H, C(3)-H), 4.24 (ddd, *J* = 1.4, 8.7, 1H, C(19'')-H_b), 4.19 (br. dt, *J* = 4.3, 9.3, 1H, C(18'')-H), 3.97 (s, 2H, C(17)H₂), 3.68 – 3.59 (m, 6H, C(14)H₂, C(15)H₂, C(28)H₂), 3.60 (s, 2H, C(1'')H₂), 3.54 (t, *J* = 5.4, 2H, C(12)H₂), 3.46 (t, *J* = 6.6, 2H, C(20)H₂), 3.43 – 3.39 (m, 2H, C(24)H₂, C(9'')H₂), 3.38 – 3.34 (m, 2H, C(11)H₂), 3.18 (m, 1H, C(4)-H), 3.18 (t, *J* = 6.6, 2H, C(4'')H₂), 3.13 – 3.08 (m, 2H, C(27)H₂), 3.04 – 2.98 (m, 2H, C(25)H₂), 2.91 (dd, *J* = 5.0, 12.7, 1H, C(4')-H_a), 2.69 (d, *J* = 12.7, 1H, C(4')-H_b), 2.44 (t, *J* = 6.6, 2H, C(21)H₂), 2.21 (t, *J* = 7.3, 2H, C(8)H₂), 1.76 – 1.52 (m, 4H, C(7)H₂, C(8'')H₂), 1.71 (m, 1H, C(5)-H_a), 1.57 (m, 1H, C(5)-H_b), 1.52 – 1.29 (m, 8H, C(6)H₂, C(5'')H₂, C(6'')H₂, C(7'')H₂); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.2 (C(9)), 174.7 (C(22)), 172.7 (C(18)), 169.3 (C(30)), 166.1 (C(1)), 136.7 (C(34)), 133.3 (C(31)), 129.3 (C(32)), 127.8 (C(33)), 94.0 (C(15'')), 79.2 (C(17'')), 73.6 (C(16'')), 73.5 (C(18'')), 72.0 (C(15)), 71.3 (C(14)), 71.2 (C(17)), 70.7 (C(12)), 68.3 (C(19'')), 63.4 (C(3)), 61.6 (C(3')), 58.2 (C(1'')), 57.0 (C(4)), 56.3, 56.2 (C(27), C(25)), 42.6 (C(9'')), 41.1 (C(4')), 2x 40.3 (C(11), C(4'')), 38.2 (C(28)), 38.1 (C(24)), 36.7 (C(8)), 36.5 (C(21)), 36.4 (C(20)), 2x 30.2 (C(5''), C(8'')), 29.8 (C(6)), 29.5 (C(5)), 2x 27.5 (C(6''), C(7'')), 26.9 (C(7)); **m/z**: 323

(73), 387 (20), 439 (17), 542 (22), 578 (17), 607 (100), 649 (15), 732 (20), 956 (14), 1109 (20);

Exakte Masse: m/z für C₅₀H₇₂F₃N₁₆O₁₄PS [M-H]⁺ berechnet: 1241.49026,
 gefunden: 1241.48979.

4.3.5 Photo-Aminosäure-Scaffolds

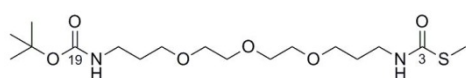


Amid 125: Zu einer Lösung von Amin **123** (1.7 g, 5.3 mmol) in DMA (45.0 ml) wurde TEA (825 µl, 5.9 mmol) und Biotin-NHS

(2.0 g, 5.9 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4.5 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.74 min) detektiert werden. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH - 20:1) gereinigt. Das Produkt **125** wurde zu 91 % (2.7 g, 4.9 mmol) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 6.83 (br. s, 1H, N(10)-H), 6.53 (br. s, 1H, N(24)-H), 4.51 (dd, *J* = 4.8, 7.5, 1H, C(3')-H), 4.31 (dd, *J* = 4.5, 7.6, 1H, C(3)-H), 3.65 – 3.61 (m, 4H, C(16)H₂, C(18)H₂), 3.60 – 3.56 (m, 4H, C(15)H₂, C(19)H₂), 3.55 (t, *J* = 5.8, 2H, C(13)H₂), 3.52 (t, *J* = 6.0, 2H, C(21)H₂), 3.33 (t, *J* = 5.4, 2H, C(11)H₂), 3.19 (t, *J* = 6.3, 2H, C(23)H₂), 3.14 (br. dt *J* = 4.6, 7.5, 1H, C(4)-H), 2.89 (dd, *J* = 4.9, 12.8, 1H, C(4')-H_a), 2.75 (d, *J* = 12.8, 1H, C(4')-H_b), 2.20 (t, *J* = 7.4, 2H, C(8)H₂), 1.80 – 1.71 (m, 4H, C(12)H₂, C(22)H₂), 1.73 (m, 1H, C(5)-H_a), 1.72 – 1.64 (m, 2H, C(7)H₂), 1.63 (m, 1H, C(5)-H_b), 1.46 – 1.39 (m, 2H, C(6)H₂), 1.42 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-NMR, CDCl₃ δ:** 173.5 (C(9)), 164.1 (C(1)), 156.2 (C(25)), 79.2 (C(^tBu)), 2x 70.6 (C(16), C(18)), 70.3, 70.2 (C(15), C(19)), 70.0 (C(13)), 69.5 (C(21)), 62.0 (C(3)), 60.4 (C(3')), 55.7 (C(4)), 40.6 (C(4')), 38.6 (C(23)), 37.9 (C(11)), 36.0 (C(8)), 29.8 (C(12)), 29.0 (C(22)), 28.6 (C(^tBu)), 28.3 (C(6)), 28.2 (C(5)), 25.8 (C(7)); **m/z:** 239 (33), 323 (41), 425 (43), 519 (32), 541 (42), 547 (100);

Exakte Masse: m/z für C₂₅H₄₆N₄O₇S [M-H]⁺ berechnet: 547.31600,
 gefunden: 547.31521.



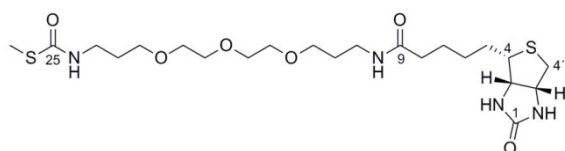
Thiocarbamat 124: Zu einer 0 °C kalten Lösung von Amin **123** (200 mg, 624 µmol) in H₂O (200 µl) wurde

S,S-Dimethylthiocarbonat (326 µl, 3.1 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur kommen gelassen und über Nacht geschüttelt. Nachdem kein weiterer Umsatz feststellbar war (Methode: Kinetex, Produkt: 3.11 min) erfolgte die Reinigung mittels

MPLC (45 → 70 % MeCN) und die Isolierung des Thiolo-carbamats **124** zu 73 % (148 mg, 375 µmol) bezogen auf wiedergewonnenes Edukt (36 mg, 112 µmol) als farbloses Öl.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 6.28 (br. s, 1H, N(4)-H), 4.97 (br. s, 1H, N(18)-H), 3.67 – 3.63 (m, 4H, C(10)H₂, C(12)H₂), 3.62 – 3.58 (m, 4H, C(9)H₂, C(13)H₂), 3.56 (t, *J* = 5.7, 2H, C(7)H₂), 3.53 (t, *J* = 6.0, 2H, C(15)H₂), 3.41 (dt, *J* = 5.7, 5.2, 2H, C(5)H₂), 3.21 (dt, *J* = 5.8, 5.3, 2H, C(17)H₂), 2.32 (s, 3H, C(1)H₃), 1.78 (quint, *J* = 6.1, 2H, C(6)H₂), 1.75 (quint, *J* = 6.3, 2H, C(16)H₂), 1.42 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-NMR, CDCl₃ δ:** 167.7 (C(3)), 156.2 (C(19)), 79.1 (C(^tBu)), 2x 70.7 (C(10), C(12)), 70.4, 70.3 (C(9), C(13)), 70.1 (C(7)), 69.7 (C(15)), 40.0 (C(5)), 38.7 (C(17)), 29.8 (C(16)), 29.0 (C(6)), 28.6 (C(^tBu)), 12.4 (C(1)); **m/z:** 134 (4), 250 (4), 300 (4), 323 (10), 395 (100);

Exakte Masse: m/z für C₁₇H₃₄N₂O₆S [M-H]⁺ berechnet: 395.22103,
 gefunden: 395.22186.



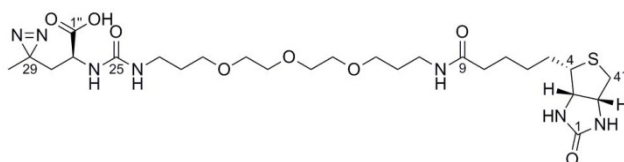
Amid 126, Methode A: Zu einer Lösung des geschützten Amins **124** (74 mg, 188 µmol) in DCM (20.0 ml) wurde TFA (1.0 ml, 12.6 mmol)

gegeben und bei Raumtemperatur für 30min bis zur vollständigen Entschützung (Methode: Kinetex, freies Amin: 1.04 min) gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt, der erhalten Rückstand erneut in DMA (10.0 ml) aufgenommen und mit TEA (132 µl, 938 µmol) versetzt. Nach Zugabe von Biotin-NHS (70 mg, 206 µmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Es konnte vollständiger Umsatz detektiert werden (Methode: Kinetex, Produkt: 2.23 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 → 40 % MeCN) gereinigt und das Produkt **126** zu 98 % (96 mg, 184 µmol) als farbloses Öl erhalten.

Methode B: Zu einer Lösung des geschützten Amins **125** (100 mg, 183.0 µmol) in DCM (4.0 ml) wurde TFA (846 µl, 10 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min bis zur vollständigen Entschützung (Methode: Kinetex, freies Amin: 1.25 min) gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt, der erhalten Rückstand erneut in H₂O (1.0 ml) aufgenommen und mit TEA (132 µl, 938 µmol) versetzt. Nach Zugabe von *S,S*-Dimethyldithiocarbonat (270 µl, 2.6 mmol) wurde die Reaktionslösung auf 40 °C erwärmt und für 2 d gerührt bis kein weiterer Umsatz festgestellt werden konnte (Methode: Kinetex, Produkt: 2.22 min). Nach anschließender Reinigung mittels MPLC (5 → 20 % MeCN) wurde das Produkt **126** zu 32 % (30 mg, 58 µmol) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 6.63 (br. s, 1H, N(10)-H), 6.50 (br. s, 1H, N(24)-H), 6.47 (br. s, 1H, N(2)-H), 5.77 (br. s, 1H, N(2')-H), 4.49 (dd, *J* = 4.7, 7.6, 1H, C(3')-H), 4.29 (dd, *J* = 4.7, 7.6,

167

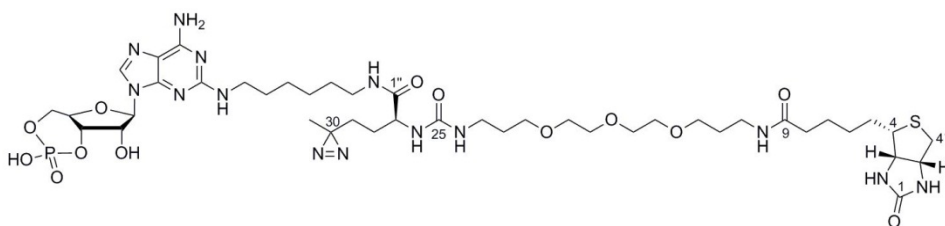


Scaffold 127: Zu einer unter Schutzgas gehaltene Lösung aus Thiolocarbamat **126** (15 mg, 29 μmol) in H_2O (1.0 ml) wurde

TEA (5 μl , 32 μmol) und Photo-Leucin (5 mg, 32 μmol) und unter Lichtausschluss auf 60 $^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach rühren über Nacht bei konstanter Temperatur und Zugabe von weiteren 0.5 Äquiv. Photo-Leucin wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.18 min) detektiert. Nach anschließender Reinigung mittels MPLC (0 \rightarrow 40 % MeCN) konnte das Scaffold **127** zu 68 % (12 mg, 19 μmol) als farbloser amorpher Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 δ : 7.10 (br. s, 1H, N(2)-H), 6.74 (t, $J = 4.7$, 1H, N(10)-H), 6.07 (d, $J = 8.0$, 1H, N(26)-H), 5.97 (t, $J = 4.7$, 1H, N(24)-H), 5.52 (br. s, 1H, N(2')-H), 4.53 (dd, $J = 4.9$, 7.8, 1H, C(3')-H), 4.39 (dd, $J = 4.8$, 8.7, 1H, C(27)-H), 4.35 (dd, $J = 4.9$, 7.8, 1H, C(3)-H), 3.69 – 3.60 (m, 8H, C(15) H_2 – C(19) H_2), 3.60 – 3.55 (m, 4H, C(13) H_2 , C(21) H_2), 3.38 – 3.33 (m, 2H, C(11) H_2), 3.32 – 3.23 (m, 2H, C(23) H_2), 3.16 (m, 1H, C(4)-H), 2.92 (dd, $J = 4.9$, 12.9, 1H, C(4')- H_a), 2.71 (d, $J = 12.9$, 1H, C(4')- H_b), 2.21 (br. t, $J = 7.5$, 2H, C(8)- H_2), 2.04 (dd, $J = 4.8$, 14.9, 1H, C(28)- H_a), 1.81 – 1.74 (m, 4H, C(12) H_2 , C(22) H_2), 1.57 (dd, $J = 8.7$, 14.9, 1H, C(28)- H_b), 1.46 – 1.38 (m, 2H, C(6) H_2), 1.08 (s, 3H, C(30) H_3); **$^{13}\text{C-NMR}$, CDCl_3 δ :** 176.8 (C(1')), 173.9 (C(9)), 158.7 (C(25)), 164.8 (C(1)), 2x 70.5 (C(16), C(18)), 2x 69.7 (C(15), C(19)), 69.5, 69.4 (C(13), C(21)), 62.1 (C(3)), 60.4 (C(3')), 55.5 (C(4)), 50.3 (C(27)), 40.7 (C(4')), 38.0 (C(23)), 37.8 (C(11)), 37.5 (C(28)), 36.3 (C(8)), 29.7 (C(22)), 29.0 (C(12)), 28.4 (C(6)), 28.2 (C(5)), 26.0 (C(7)), 24.5 (C(29)), 20.1 (C(30)); **m/z :** 284 (87), 448 (31), 452 (52), 473 (100), 544 (23), 588 (36), 598 (88);

Exakte Masse: m/z für $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M-H}]^+$ berechnet: 616.31231,
gefunden: 616.31296.

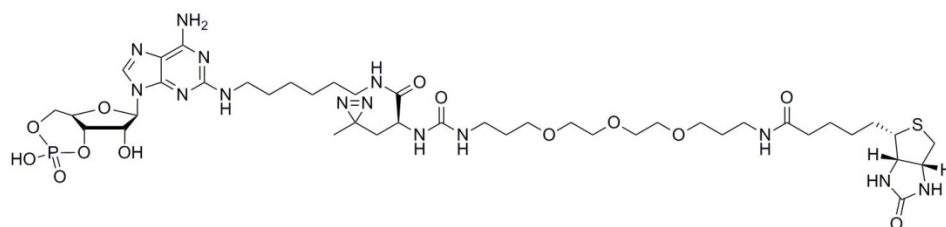


CC 135: Zu einer Lösung von Scaffold **128** (11 mg, 17 μmol) und

HATU (7 mg, 19 μmol) in DMA (5.0 ml) wurde DIPEA (15 μl , 87 μmol) und cAMP **119** (9 mg, 19 μmol) gegeben. Nach 1.5 h rühren bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurden noch 0.5 Äquiv. HATU hinzu gegeben und weiter für 1.5 h gerührt. Es konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.12 min, Cyclisierungsprodukt: 2.51min) detektiert werden. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC gereinigt. Die Capture Compound **135** wurde zu 14 % (3 mg, 2 μmol) als farbloser amorpher Feststoff isoliert.

m/z: 324 (100), 354 (31), 387 (23), 469 (24), 519 (22), 579 (25), 649 (31), 833 (40);

Exakte Masse: m/z für C₄₃H₇₁N₁₄O₁₃PS [M-H]⁺ berechnet: 1055.48561,
 gefunden: 1055.48775.



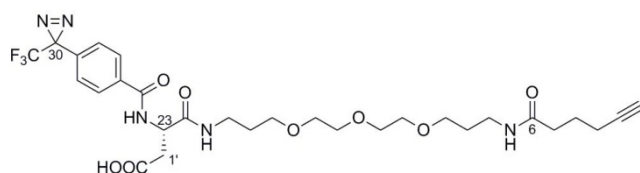
CC 134: Zu einer Lösung von Scaffold **127** (12 mg, 19 µmol), cAMP (10 mg,

21 µmol) und DIPEA (17 µl, 97 µmol) in DMA (2.0 ml) wurde HATU (8 mg, 21 µmol) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Es konnte fast vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.03 min, Cyclisierungsprodukt: 2.33 min) detektiert werden. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC und anschließender präparativer HPLC isoliert. Die Capture Compound **134** wurde zu 22 % (4 mg, 4 µmol) als farbloser amorpher Feststoff isoliert.

m/z: 732 (94), 833 (100), 957 (92);

Exakte Masse: m/z für C₄₂H₆₉N₁₄O₁₃PS [M-H]⁺ berechnet: 1041.56996,
 gefunden: 1041.56998.

4.3.6 Synthese eines clickfähigen Scaffolds & Capture Compound



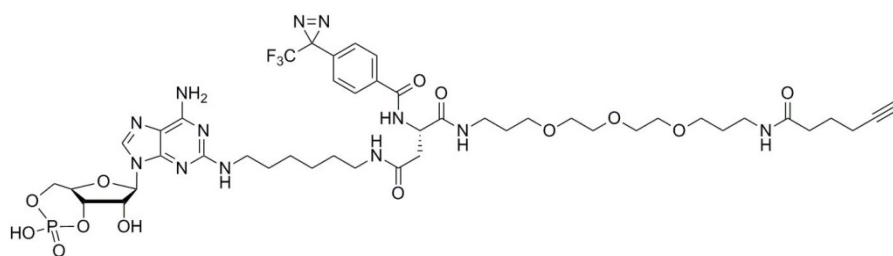
Scaffold 137: Zu einer Lösung des Amins **21** (25 mg, 46 µmol) und NHS-Ester **136** (10 mg, 47 µmol) in DMA

(5.0 ml) wurde TEA (650 µl, 4.6 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 h konnte vollständiger Umsatz detektiert werden (Methode: Kinetex, Produkt: 3.18 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 → 80 % MeCN) gereinigt und das Produkt **137** zu 98 % (29 mg, 44 µmol) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.95/7.35 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.}), 4.90 (m, 1H, C(23)-*H*), 3.62 – 3.53 (m, 8H, C(16)*H*₂ – C(12)*H*₂), 3.52, 3.51 (2t, *J*₁ = 6.1, *J*₂ = 6.2, 2x 2H, C(18)*H*₂, C(10)*H*₂), 3.33 – 3.29 (m, 2H, C(20)*H*₂), 3.25 (t, *J* = 6.8, 2H, C(8)*H*₂), 2.95 (dd, *J* = 6.0, 16.6, 1H, C(1')-*H*_a), 2.81 (dd, *J* = 7.7, 16.6, 1H, C(1')-*H*_b), 2.81 – 2.71 (m, 6H, C(19)*H*₂, C(9)*H*₂, C(4)*H*₂), 2.29 (t, *J* = 7.5, 2H, C(5)*H*₂), 2.26 (t, *J* = 2.7, 1H, C(1)-*H*), 2.20 (dt, *J* = 2.7, 7.0, 2H, C(3)*H*₂);
¹³C-NMR, MeOD δ: 175.3 (C(6)), 174.0 (C(2')), 172.8 (C(22)), 168.7 (C(25)), 136.7

(C(29)), 133.3 (C(26)), 129.4 (C(27)), 127.6 (C(28)), 123.4 (q, $J = 274$, C(31)), 84.2 (C(2)), 2x 71.5 (C(13), C(15)), 2x 71.2 (C(12), C(16)), 70.3 (C(1)), 2x 69.9 (C(10), C(18)), 52.2 (C(23)), 38.1 (C(20)), 37.8 (C(8)), 36.8 (C(1')), 35.9 (C(5)), 30.4, 30.2 (C(9), C(19)), 29.4 (q, $J = 40$, C(30)), 25.9 (C(4)), 18.7 (C(3)); **m/z**: 444 (100);

Exakte Masse: m/z für $C_{29}H_{38}F_3N_5O_8$ $[M-H]^+$ berechnet: 642.27452,
 gefunden: 642.27524.



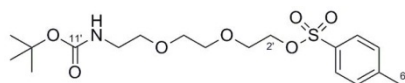
cAMP-CC 138: Zu einer Lösung von Scaffold **137** (10 mg, 16 μ mol) und cAMP **119** (8 mg, 18 μ mol)

in DMA (1.0 ml) wurde DIPEA (13 μ l, 78 μ mol) und HATU (7 mg, 18 μ mol) gegeben und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach Rühren über Nacht konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.78 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (15 \rightarrow 45 % MeCN) gereinigt und das Produkt **138** zu 36 % (6 mg, 7 μ mol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

m/z: 679 (24), 708 (23), 839 (21), 922 (23), 957 (22), 996 (24), 1067 (100);

Exakte Masse: m/z für $C_{45}H_{62}F_3N_{12}O_{13}P$ $[M-H]^+$ berechnet: 1067.43218,
 gefunden: 1067.43298.

4.3.7 Synthese eines photospaltbaren Biotin-Azid-Linkers

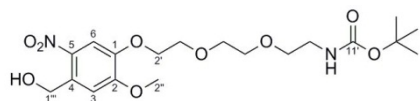


Alkohol 142: Zu einer Lösung von Alkohol **141** (100 mg, 401 μ mol) und TsCl (84 mg, 441 μ mol) in DCM (50.0 ml) wurde DMAP (4.9 mg, 40 μ mol) und TEA (62 μ l, 441 μ mol) gegeben und für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Die HPLC-MS zeigte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.56 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (40 \rightarrow 80% MeCN) gereinigt und das Produkt **142** zu 93 % (151 mg, 401 μ mol) als farbloses Öl erhalten.

1H -NMR, $CDCl_3$ δ : 7.80/7.34 (AA'/BB', $J = 8.2$, 4H, $H_{arom.}$), 4.94 (br. s, 1H, N(10')-H), 4.18 – 4.15 (m, 2H, C(2') H_2), 3.70 – 3.68 (m, 2H, C(3') H_2), 3.59 – 4.56 (m, 2H, C(5') H_2), 3.55 – 3.53 (m, 2H, C(6') H_2), 3.52 – 3.48 (m, 2H, C(8') H_2), 3.33 – 3.25 (m, 2H, C(9') H_2), 2.44 (s, 3H, C(6)- H_3), 1.43 (s, 9H, t Bu); **^{13}C -NMR, $CDCl_3$ δ :** 156.3 (C(11')), 145.0 (C(2)), 133.1 (C(5)), 130.0 (C(4)), 128.1 (C(3)), 79.4 (C(t Bu)), 70.8, 70.4 (C(5'), C(6')), 70.3, 70.2 (C(8')),

C(9')), 69.3 (C(2')), 68.9 (C(3')), 28.5 (C(^tBu)), 21.8 (C(6)); **m/z**: 137 (12), 165 (31), 184 (13), 204 (14), 257 (12), 277 (16), 309 (30), 323 (100), 354 (33), 387 (17);

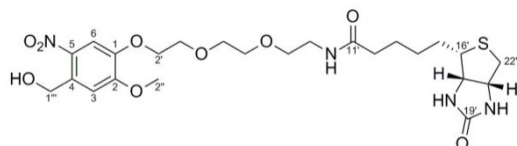
Exakte Masse: m/z für C₁₈H₂₉NO₇S [M-H]⁺ berechnet: 404.17375,
gefunden: 404.17365.



Phenolether 144: Eine Lösung von Alkohol **142** (134 mg, 332 μmol) und Nitrophenol **143** (51 mg, 255 μmol) in MeCN (5 ml) wurde in Gegenwart von K₂CO₃ (88 mg, 639 μmol) über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Trotz unvollständigem Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.17 min, Nitrophenol **143**: 1.57 – 1.62 min) wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC (20 → 50 % MeCN) gereinigt. Das Produkt **144** wurde zu 31 % (34 mg, 79 μmol) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR, CDCl₃ δ: 7.72 (s, 1H, C(6)-H_{arom.}), 7.18 (s, 1H, C(3)-H_{arom.}), 5.11 (br. s, 1H, N(10')-H), 4.95 (s, 2H, C(1''')H₂), 4.90 (t, J = 4.7, 2H, C(3')H₂), 4.22 (t, J = 4.6, 2H, C(2')H₂), 3.94 (s, 3H, C(2'')-H₃), 3.72 – 3.70 (m, 2H, C(5')H₂), 3.66 – 3.64 (m, 2H, C(6')H₂), 3.52 (t, J = 5.1, 2H, C(8')H₂), 3.09 (br. s, 1H, O(2''')-H), 1.39 (s, 9H, ^tBu); **¹³C-NMR, CDCl₃ δ:** 156.2 (C(11')), 154.4 (C(2)), 147.1 (C(1)), 139.4 (C(5)), 133.3 (C(4)), 110.9 (C(3)), 110.0 (C(6)), 79.3 (C(^tBu)), 71.0 (C(5')), 70.4 (C(6')), 70.3 (C(8')), 69.6 (C(3')), 69.1 (C(2')), 62.6 (C(1''')), 56.5 (C(2'')), 28.5 (C(^tBu)); **m/z**: 165 (14), 313 (100), 323 (23), 343 (16), 361 (20);

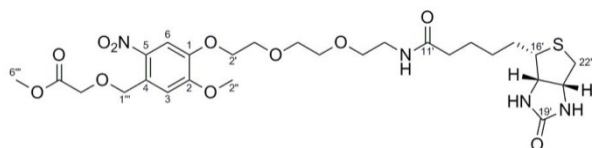
Exakte Masse: m/z für C₁₉H₃₀N₂O₉ [M-H]⁺ berechnet: 431.20241,
gefunden: 431.20078.



Amid 145: Zu einer Lösung von Phenolether **144** (55 mg, 128 μmol) in DMC (10.0 ml) wurde TFA (984 μl, 12.8 mmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die HPLC-MS zeigte vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, freies Amin: 2.01 min) und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde erneut in DMA (5.0ml) aufgenommen und mit DIPEA (109 μl, 639 μmol) versetzt. Nach Zugabe von Botin-NHS wurde die Reaktionslösung für eine Stunde bis zum vollständigen Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.96 min) bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung des erhaltenen Rückstandes mittels MPLC (10 → 50 % MeCN) wurde das Produkt **145** als grünlich gelber Feststoff zu 53 % (38 mg, 68 μmol) erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ : 7.77 (s, 1H, C(6)-*H*_{arom.}), 7.41 (s, 1H, C(3)-*H*_{arom.}), 4.95 (s, 2H, C(1'')*H*₂), 4.47 (br. dd, J = 4.9, 7.9, 1H, C(21')-*H*), 4.28 (dd, J = 4.5, 7.9, 1H, C(17')-*H*), 4.23 – 4.21 (m, 2H, C(2')*H*₂), 3.97 (s, 3H, C(2'')*H*₂), 3.90 – 3.88 (m, 2H, C(3')*H*₂), 3.74 – 3.72 (m, 2H, C(5')*H*₂), 3.66 – 3.63 (m, 2H, C(6')*H*₂), 3.55 (t, J = 5.4, 2H, C(8')*H*₂), 3.35 (t, J = 5.4, 2H, C(9')*H*₂), 3.16 (ddd, J = 4.6, 5.8, 8.9, 1H, C(16')-*H*), 2.90 (dd, J = 5.0, 12.8, 1H, C(22')-*H*_a), 2.69 (d, J = 12.8, 1H, C(22')-*H*_b), 2.18 (t, J = 7.4, 2H, C(12')*H*₂), 1.69 (m, 1H, C(15')-*H*_a), 1.67 – 1.58 (m, 2H, C(13')*H*₂), 1.56 (m, 1H, C(15')-*H*_b), 1.43 – 1.35 (m, 2H, C(14')*H*₂); **¹³C-NMR, MeOD δ :** 176.1 (C(11')), 166.0 (C(19')), 155.7 (C(2)), 148.1 (C(1)), 140.2 (C(5)), 135.3 (C(4)), 111.2 (C(6)), 111.0 (C(3)), 71.8 (C(5')), 71.3 (C(6')), 70.7 (C(3')), 70.6 (C(8')), 70.3 (C(2')), 63.3 (C(17')), 62.2 (C(1'')'), 61.6 (C(21')), 57.0 (C(16')), 56.8 (C(2'')), 41.0 (C(22')), 40.4 (C(9')), 36.7 (C(12')), 29.7 (C(14')), 29.4 (C(15')), 26.8 (C(13')); **m/z:** 166 (9), 227 (65), 270 (100), 282 (34), 298 (18), 308 (14), 351 (9), 390 (15), 495 (42), 521 (61), 539 (80);

Exakte Masse: m/z für C₂₄H₃₆N₄O₉ [M-H]⁺ berechnet: 557.22758,
gefunden: 557.22775.



Benzylether 146: Zu einer Lösung von Nitroben-zylalkohol **145** (34 mg, 61 mol) in DMF (1.7 ml) wurde Natriumhydrid (60%ige

Suspension, 1.6 mg, 67 μ mol) und Brommethylacetat (10.3 mg, 67 μ mol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für insgesamt einen Tage gerührt. Der Umsatz wurde stündlich per HPLC-MS überprüft. Trotz mehrmaliger Zugabe von 1 Äquiv. an Natriumhydrid und Brommethylacetat blieb der Umsatz bei ca. 50 % nach einem Tag stehen (Methode: Kinetex, Produkt: 3.43 min). Die Reaktion wurde durch Zugabe von wässriger 1M HCl (1 ml) wurde die Reaktion gestoppt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung des erhaltenen Rückstandes mittels MPLC (20 \rightarrow 60 % MeCN) wurde das Produkt **146** als grünlich gelber Feststoff zu 33 % (10 mg, 16 μ mol) bezogen auf wiedergewonnenes Edukt **145** (8 mg, 15 μ mol) erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ : 7.97 (t, J = 4.9, 1H, N(10')-*H*), 7.78 (s, 1H, C(6)-*H*_{arom.}), 7.42 (s, 1H, C(3)-*H*_{arom.}), 4.97 (br. s, 2H, C(1'')'*H*₂), 4.47 (ddd, J = 0.8, 4.8, 7.8, 1H, C(21')-*H*), 4.31 (s, 2H, C(3'')*H*₂), 4.28 (dd, J = 4.4, 7.8, 1H, C(17')-*H*), 4.25 – 4.22 (m, 2H, C(2')*H*₂), 3.97 (s, 3H, C(2'')*H*₂), 3.90 – 3.88 (m, 2H, C(3')*H*₂), 3.77 (s, 3H, C(6'')'*H*₃), 3.74 – 3.71 (m, 2H, C(5')*H*₂), 3.66 – 3.63 (m, 2H, C(6')*H*₂), 3.55 (t, J = 5.5, 2H, C(8')*H*₂), 3.36 (dt, J = 4.9, 5.4, 2H, C(9')*H*₂), 3.17 (ddd, J = 4.5, 5.8, 8.8, 1H, C(16')-*H*), 2.90 (dd, J = 5.0, 12.8, 1H, C(22')-*H*_a), 2.69 (d, J = 12.8, 1H, C(22')-*H*_b), 2.18 (t, J = 7.4, 2H, C(12')*H*₂), 1.70 (m, 1H, C(15')-

H_a), 1.66 – 1.58 (m, 2H, C(13') H_2), 1.56 (m, 1H, C(15')- H_b), 1.43 – 1.35 (m, 2H, C(14') H_2); ^{13}C -NMR, MeOD δ : 176.1 (C(11')), 172.6 (C(4''')), 166.1 (C(19')), 155.7 (C(2)), 148.5 (C(1)), 140.7 (C(5)), 131.2 (C(4)), 111.6 (C(3)), 111.2 (C(6)), 71.8 (C(5')), 71.3 (C(6')), 71.1 (C(1''')), 70.7 (C(3')), 70.6 (C(8')), 70.3 (C(2')), 69.0 (C(3''')), 63.3 (C(17')), 61.6 (C(21')), 57.0 (C(16')), 56.9 (C(2'')), 52.4 (C(6''')), 41.0 (C(22')), 40.4 (C(9')), 36.7 (C(12')), 29.7 (C(14')), 29.5 (C(15')), 26.8 (C(13')); m/z : 227 (42), 270 (100), 323 (42), 354 (8), 390 (10), 429 (12), 468 (7), 495 (36), 521 (50), 539 (63), 578 (12);

N=[N+]#NCCOCCOCCNC(=O)COc1cc(OC)c(OC)c([N+](=O)[O-])c1COC(=O)OCCOCCOCCNC(=O)CCCC[C@H]2S[C@@H](C(=O)N)N[C@H]2

in DCM (1.0 ml) wurde TFA (100 μ l, 1259 μ mol) gegeben und für 30 min bis zum vollständigem Umsatz (Methode: Kinetex, freies Amin: 0.97 min) gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt **148** so weiter umgesetzt.

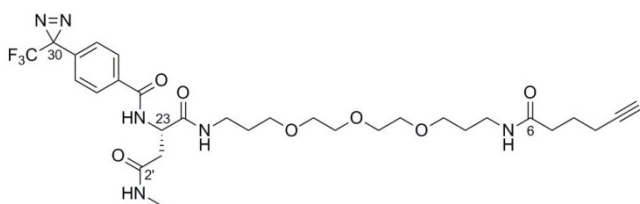
Die aus den Schritten a) und b) erhaltenen Substanzen **148** und **149** wurden zusammen in DMA (2.0 ml) gelöst und anschließend mit DIPEA (14.0 µl, 80 µmol) und HATU (6.7 mg, 17 µmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss für 4.5 h gerührt. Nach erneuter Zugabe einer Spatelspitze HATU wurde die Reaktionslösung über Nacht weiter gerührt. Es konnte fast vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.40 min) festgestellt werden. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt **150** nach Reinigung mittels MPLC (20 → 50 % MeCN) zu 66 % (HABA-Avidin-Bestimmung, 8.1 mg, 10.5 µmol) als grünlich gelber Feststoff erhalten.

173

C(6'')H₂), 3.35 (t, $J = 5.4$, 2H, C(9')H₂), 3.34 – 3.32 (m, 2H, C(13'')H₂), 3.17 (ddd, $J = 4.6$, 5.8, 8.8, 1H, C(16')-H), 2.91 (dd, $J = 5.0$, 12.8, 1H, C(22')-H_a), 2.69 (d, $J = 12.8$, 1H, C(22')-H_b), 2.19 (t, $J = 7.4$, 2H, C(12')H₂), 1.69 (m, 1H, C(15')-H_a), 1.66 – 1.59 (m, 2H, C(13')H₂), 1.57 (m, 1H, C(15')-H_b), 1.45 – 1.36 (m, 2H, C(14')H₂); ¹³C-NMR, MeOD: 176.1 (C(11')), 172.2 (C(4'')), 166.1 (C(19')), 155.6 (C(2)), 148.7 (C(1)), 141.1 (C(5)), 130.5 (C(4)), 112.0 (C(3)), 111.3 (C(6)), 71.8 (C(5')), 71.5, 3x 71.3, 2x 71.1 (C(9'') – C(12''), C(3''), C(1'')), C(6')), 70.7 (C(3')), 70.6 (C(8')), 70.5 (C(7'')), 70.4 (C(2')), 63.3 (C(17')), 61.6 (C(21')), 2x 57.0 (C(2''), C(16')), 51.7 (C(13'')), 41.1 (C(22')), 40.4 (C(9'')), 39.9 (C(6'')), 36.7 (C(18')), 29.7 (C(14')), 29.5 (C(15')), 26.8 (C(13')); m/z: 227 (17), 270 (53), 323 (13), 429 (24), 495 (23), 521 (43), 539 (60), 640 (100);

Exakte Masse: m/z für C₂₇H₄₀N₄O₁₁ [M-H]⁺ berechnet: 771.33417,
 gefunden: 771.33516.

4.3.8 Synthese von zellgängigen Scaffolds & Capture Compounds



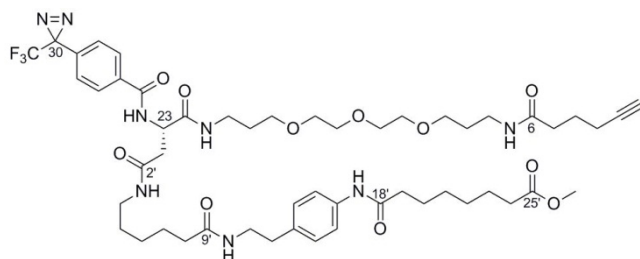
Scaffold 158: Zu einer Lösung des Scaffolds **137** (9 mg, 14 μmol) und 2m Methylamin-Lsg. in THF (8 μl, 15 μmol) in DMA (1.0 ml) wurden DIPEA (3 μl,

18 μmol) und HATU (6 mg, 15 μmol) gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 40 min gerührt. Mittels HPLC-MS konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.69 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (24 → 60 % MeCN) gereinigt und das Produkt **158** zu 87 % (8 mg, 12 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.94/7.36 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 4.86 (m, 1H, C(23)-H), 3.62 – 3.58 (m, 4H, C(13)H₂, C(15)H₂), 3.58 – 3.54 (m, 4H, C(12)H₂, C(16)H₂), 3.51 (2t, $J = 6.1$, 2x 2H, C(10)H₂, C(18)H₂), 3.29 (t, $J = 6.7$, 2H, C(20)H₂), 3.24 (t, $J = 6.8$, 2H, C(8)H₂), 2.79 (dd, $J = 5.9$, 15.0, 1H, C(1')-H_a), 2.71 (s, 3H, C(4')H₃), 2.70 (dd, $J = 7.4$, 15.0, 1H, C(1')-H_b), 2.82 – 2.71 (m, 6H, C(19)H₂, C(9)H₂, C(4)H₂), 2.29 (t, $J = 7.5$, 2H, C(5)H₂), 2.26 (t, $J = 2.6$, 1H, C(1)-H), 2.20 (dt, $J = 2.6$, 7.1, 2H, C(3)H₂); ¹³C-NMR, MeOD δ: 175.3 (C(6)), 2x 172.9 (C(22), C(2')), 168.5 (C(25)), 136.7 (C(29)), 133.4 (C(26)), 129.3 (C(27)), 127.7 (C(28)), 84.2 (C(2)), 2x 71.5 (C(13), C(15)), 2x 71.2 (C(12), C(16)), 70.3 (C(1)), 2x 69.9 (C(10), C(18)), 52.7 (C(23)), 38.3 (C(1')), 38.1 (C(20)), 37.8 (C(8)), 35.9 (C(5)), 30.4, 30.3 (C(9),

C(19)), 26.4 (C(4')), 26.0 (C(4)), 18.6 (C(3)); **m/z**: 315 (94), 324 (18), 429 (25), 596 (100), 609 (14), 626 (88), 637 (19);

Exakte Masse: m/z für C₃₀H₄₁F₃N₆O₇ [M-H]⁺ berechnet: 655.30616,
 gefunden: 655.30706.



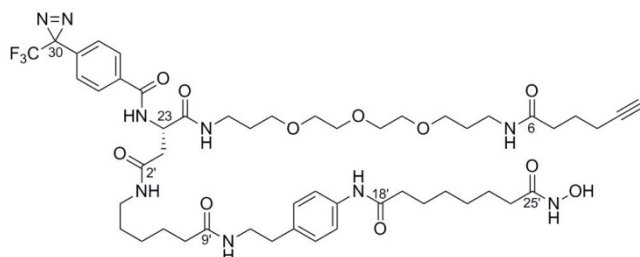
SAHA-CC 160: Zu einer Lösung des geschützten SAHA-Derivates **159** (8 mg, 15 µmol) in DCM (2.0 ml) wurde TFA (108 µl, 1.4 mmol) gegeben. Nach 30 min rühren bei Raumtemperatur konnte

vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Kinetex, freies Amin: 2.78 min) werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (2.0 ml) aufgenommen mit DIPEA (12 µl, 70 µmol), Scaffold **137** (9 mg, 14 µmol) und HATU (6 mg, 15 µmol) versetzt. Nach rühren bei Raumtemperatur über Nacht und unter Lichtausschluss wurde noch DIPEA (3 µl, 18 µmol) und HATU (3 mg, 8 µmol) hinzu gegeben. Nach weiteren 2 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.78 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (40 → 80 % MeCN) gereinigt und das Produkt **160** zu 69 % (10 mg, 10 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD/CDCl₃ δ: 7.92/7.31 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.}), 7.45/7.13 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.} (SAHA)), 4.86 (dd, *J* = 5.8, 7.1, 1H, C(23)-*H*), 3.64 (s, 3H, C(27')H₃), 3.61 – 3.52 (m, 8H, C(12)H₂, C(13)H₂, C(15)H₂, C(16)H₂), 3.50 (2t, *J* = 6.0, 2x 2H, C(10)H₂, C(18)H₂), 3.37 (t, *J* = 7.1, 2H, C(11')H₂), 3.29 (t, *J* = 6.7, 2H, C(20)H₂), 3.24 (t, *J* = 6.7, 2H, C(8)H₂), 3.13 (br. t, *J* = 7.0, 2H, C(4')H₂), 2.77 – 2.71 (m, 2H, C(12')H₂), 2.76 (dd, *J* = 5.9, 15.0, 1H, C(1')-*H*_a), 2.70 (dd, *J* = 7.1, 15.0, 1H, C(1')-*H*_b), 2.34 (t, *J* = 7.4, 2H, C(19')H₂), 2.31 (t, *J* = 7.5, 2H, C(24')H₂), 2.28 (t, *J* = 7.5, 2H, C(5)H₂), 2.19 (dt, *J* = 2.7, 7.0, 2H, C(3)H₂), 2.17 (t, *J* = 2.7, 1H, C(1)-*H*), 2.09 (t, *J* = 7.4, 2H, C(8')H₂), 1.82 – 1.71 (m, 6H, C(4)H₂, C(9)H₂, C(19)H₂), 1.71 – 1.65 (m, 2H, C(20')H₂), 1.65 – 1.57 (m, 2H, C(23')H₂), 1.53 (quint, *J* = 7.5, 2H, C(7')H₂), 1.48 – 1.41 (m, 2H, C(5')H₂), 1.39 – 1.34 (m, 4H, C(21')H₂, C(22')H₂), 1.28 – 1.20 (m, 2H, C(6')H₂); **¹³C-NMR, MeOD/CDCl₃ δ:** 175.8 (C(9')), 175.7 (C(25')), 175.0 (C(6)), 174.2 (C(18')), 172.4 (C(22)), 171.9 (C(2')), 168.0 (C(25)), 137.8 (C(16')), 136.1 (C(29)), 135.9 (C(13')), 133.3 (C(26)), 129.9 (C(15')), 129.0 (C(27)), 127.5 (C(28)), 123.1 (q, *J* = 274, C(31)), 121.2 (C(14')), 83.9 (C(2)), 71.3, 71.2 (C(13), C(15)), 2x 71.0 (C(12), C(16)), 70.0 (C(1)), 69.8, 69.7 (C(10), C(18)), 52.3 (C(23)), 52.0 (C(27')), 41.6 (C(11')), 40.1 (C(4')), 38.3 (C(1')), 38.0 (C(20)), 2x 37.7 (C(8), C(19')),

36.7 (C(8')), 2x 35.7 (C(5), C(12')), 34.6 (C(24')), 30.1, 30.0 (C(9), C(19)), 2x 29.7, 29.6 (C(5'), C(21'), C(22')), 29.2 (q, $J = 41$, C(30)), 27.2 (C(6')), 26.5 (C(20')), 26.3 (C(7')), 2x 25.6 (C(4), C(23')), 18.5 (C(3)); **m/z**: 324 (100), 354 (28), 387 (31), 446 (29), 469 (24), 519 (21), 540 (25), 579 (30), 649 (42), 732 (33), 833 (35), 957 (31);

Exakte Masse: m/z für C₅₂H₇₃F₃N₈O₁₁ [M-H]⁺ berechnet: 1043.54237,
 gefunden: 1043.54507.



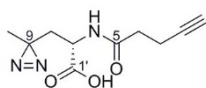
SAHA-CC 161: Zu einer Lösung von SAHA-CC **160** (10 mg, 10 μmol) in Wasser/THF (1:1, 2.0 ml) wurde LiOH (2 mg, 84 μmol) gegeben und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur

gerührt. Nach 2 h konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.79 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde nach Zugabe von 2m wässriger HCl (48 μl, 96 μmol) unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (1.0 ml) aufgenommen und mit DIPEA (2 μl, 11 μmol) und Ethylchlorformat (1 μl, 11 μmol) bei Raumtemperatur für 20 min gerührt. Anschließend wurde zu der Reaktionslösung eine Lösung aus Hydroxylaminhydrochlorid (3 mg, 43 μmol) und DIPEA (8 μl, 47 μmol) in DMA (0.5 ml) gegeben und weiter bei konstanter Temperatur gerührt. Über Nacht konnte ca. 70 %iger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.65 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (30 → 70 % MeCN) gereinigt und das Produkt **161** zu 100 % (7 mg, 6.7 μmol) bezogen auf wieder gewonnene freie Säure der Capture Compound (3 mg, 2.9 μmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.94/7.35 (AA'/BB', $J = 8.4$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 7.45/7.15 (AA'/BB', $J = 8.5$, 4H, $H_{\text{arom.}}$ (SAHA)), 4.89 (m, 1H, C(23)-H), 3.61 – 3.53 (m, 8H, C(12)H₂, C(13)H₂, C(15)H₂, C(16)H₂), 3.51 (t, $J = 6.2$, 2H, C(18)H₂), 3.50 (t, $J = 6.2$, 2H, C(10)H₂), 3.41 – 3.36 (m, 2H, C(11')H₂), 3.29 (br. t, $J = 6.7$, 2H, C(20)H₂), 3.24 (t, $J = 6.9$, 2H, C(8)H₂), 3.16 – 3.12 (m, 2H, C(4')H₂), 2.80 (dd, $J = 5.8$, 14.9, 1H, C(1')-H_a), 2.75 (t, $J = 7.4$, 2H, C(12')H₂), 2.70 (dd, $J = 7.6$, 14.9, 1H, C(1')-H_b), 2.35 (t, $J = 7.4$, 2H, C(19')H₂), 2.29 (t, $J = 7.5$, 2H, C(5)H₂), 2.25 (t, $J = 2.7$, 1H, C(1)-H), 2.20 (dt, $J = 2.7$, 7.0, 2H, C(3)H₂), 2.10 (t, $J = 7.4$, 2H, C(8')H₂), 2.09 (t, $J = 7.5$, 2H, C(24')H₂), 1.82 – 1.71 (m, 6H, C(4)H₂, C(9)H₂, C(19)H₂), 1.71 – 1.65 (m, 2H, C(20')H₂), 1.65 – 1.58 (m, 2H, C(23')H₂), 1.52 (quint, $J = 7.5$, 2H, C(7')H₂), 1.48 – 1.40 (m, 2H, C(5')H₂), 1.40 – 1.34 (m, 4H, C(21')H₂, C(22')H₂), 1.29 – 1.20 (m, 2H, C(6')H₂); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.0 (C(9')), 175.3 (C(6)), 174.5 (C(18')), 2x 172.9 (C(22)),

C(25')), 172.2 (C(2')), 168.4 (C(25)), 138.2 (C(16')), 136.6 (C(29)), 136.3 (C(13')), 133.4 (C(26)), 130.2 (C(15')), 129.3 (C(27)), 127.7 (C(28)), 123.3 (q, $J = 274$, C(31)), 121.4 (C(14')), 84.2 (C(2)), 2x 71.5 (C(13), C(15)), 2x 71.2 (C(12), C(16)), 70.3 (C(1)), 2x 69.9 (C(10), C(18)), 52.7 (C(23)), 41.8 (C(11')), 40.3 (C(4')), 38.5 (C(1')), 38.2 (C(20)), 2x 37.8 (C(8), C(19')), 36.9 (C(8')), 2x 35.9 (C(5), C(12')), 33.7 (C(24')), 30.4, 30.3 (C(9), C(19)), 30.0 (C(5')), 29.9, 29.8 (C(21'), C(22')), 29.5 (q, $J = 41$, C(30)), 27.4 (C(6')), 26.8, 2x 26.6 (C(7'), C(20'), C(23')), 26.0 (C(4)), 18.6 (C(3)); **m/z**: 324 (43), 429 (100), 519 (13), 579 (14), 649 (20), 732 (19), 833 (12), 956 (17);

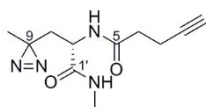
Exakte Masse: m/z für $C_{51}H_{72}F_3N_9O_{11}$ $[M-H]^+$ berechnet: 1044.53762,
gefunden: 1044.53862.



Scaffold 165: Zu einer Lösung von Photo-L-Leucin (10 mg, 70 μ mol) und DIPEA (36 μ l, 210 μ mol) in DMF (1.0 ml) wurde NHS-Ester **164** (20 mg, 103 μ mol) gegeben. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.55 min) detektiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC (10 \rightarrow 50 % MeCN) gereinigt. Das Scaffold **165** wurde als farbloser amorpher Feststoff zu 77 % (12 mg, 54 μ mol) erhalten.

1H -NMR, MeOD δ : 4.40 (dd, $J = 4.5$, 10.1, 1H, C(7)-H), 2.51 – 2.50 (m, 4H, C(3) H_2 , C(4) H_2), 2.26 (t, $J = 2.5$, 1H, C(1)-H), 2.04 (dd, $J = 4.5$, 14.9, 1H, C(8)- H_a), 1.57 (dd, $J = 10.1$, 14.9, 1H, C(8)- H_b), 1.06 (s, 3H, C(10) H_3); **^{13}C -NMR, MeOD δ :** 174.3 (C(1')), 173.9 (C(5)), 83.5 (C(2)), 70.3 (C(1)), 49.9 (C(7)), 37.8 (C(8)), 35.9 (C(4)), 25.0 (C(9)), 19.8 (C(10)), 15.5 (C(3)); **m/z**: 81 (10), 110 (10), 166 (100), 183 (7), 195 (7), 208 (9);

Exakte Masse: m/z für $C_{10}H_{13}N_3O_3$ $[M-H]^+$ berechnet: 224.10297,
gefunden: 224.10268.

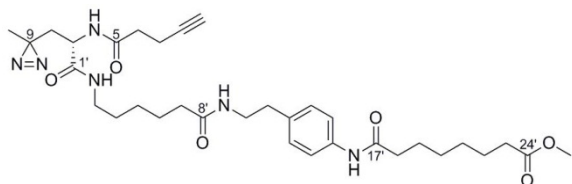


Scaffold-Amid 166: Zu einer Lösung des Scaffolds **165** (4 mg, 18 μ mol) und 2M Methylamin-Lsg. in THF (10 μ l, 20 μ mol) in DMA (1.0 ml) wurden DIPEA (3 μ l, 18 μ mol) und HATU (7 mg, 18 μ mol) gegeben. Nach 35 min rühren bei Raumtemperatur wurde vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 2.55 min) detektiert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Reinigung mittels MPLC (10 \rightarrow 50 % MeCN) wurde das Produkt **166** zu 94 % (4 mg, 17 μ mol) als farbloser amorpher Rückstand isoliert.

1H -NMR, MeOD δ : 4.29 (dd, $J = 5.0$, 10.0, 1H, C(7)-H), 2.73 (s, 3H, C(3') H_3), 2.52 – 2.50 (m, 4H, C(3) H_2 , C(4) H_2), 2.30 (t, $J = 2.5$, 1H, C(1)-H), 2.01 (dd, $J = 5.0$, 14.9, 1H, C(8)- H_a), 1.50 (dd, $J = 10.0$, 14.9, 1H, C(8)- H_b), 1.03 (s, 3H, C(10) H_3); **^{13}C -NMR, MeOD δ :** 173.9

(C(5)), 173.7 (C(1')), 83.6 (C(2)), 70.4 (C(1)), 50.8 (C(7)), 37.8 (C(8)), 35.9 (C(4)), 26.4 (C(3')), 24.9 (C(9)), 19.8 (C(10)), 15.5 (C(3)); **m/z**: 81 (12), 93 (5), 111 (17), 166 (100), 199 (9), 206 (14);

Exakte Masse: **m/z** für C₁₁H₁₆N₄O₂ [M-H]⁺ berechnet: 237.13460,
gefunden: 237.13459.

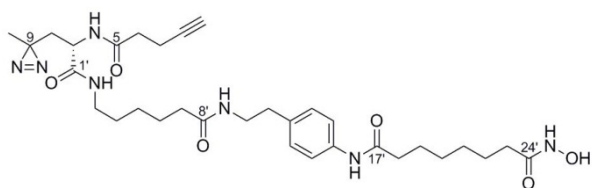


SAHA-CC 167: Zu einer Lösung des geschützten SAHA-Derivates **159** (20 mg, 38 µmol) in DCM (4.0 ml) wurde TFA (276 µl, 3.6 mmol) gegeben. Nach 30 min rühren bei

Raumtemperatur konnte vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Kinetex, Produkt: 2.78 min) werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (2.0 ml) aufgenommen mit DIPEA (61 µl, 358 µmol), Scaffold **165** (8 mg, 36 µmol) und HATU (15 mg, 39 µmol) versetzt. Nach rühren bei Raumtemperatur über Nacht und unter Lichtausschluss wurde noch DIPEA (6 µl, 36 µmol) und HATU (7 mg, 18 µmol) hinzu gegeben. Nach einer weiteren Stunde konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.78 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (40 → 80 % MeCN) gereinigt und das Produkt **167** zu 85 % (19 mg, 30 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.47/7.16 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.}), 4.29 (dd, *J* = 5.2, 9.9, 1H, C(7)-*H*), 3.64 (s, 3H, C(26')*H*₃), 3.39 (t, *J* = 7.2, 2H, C(10')*H*₂), 3.15 (dt, *J* = 2.1, 7.0, 2H, C(3')*H*₂), 2.75 (t, *J* = 7.2, 2H, C(11')*H*₂), 2.51 – 2.49 (m, 4H, C(3)*H*₂, C(4)*H*₂), 2.35 (t, *J* = 7.4, 2H, C(18')*H*₂), 2.33 (t, *J* = 7.4, 2H, C(23')*H*₂), 2.29 (t, *J* = 2.5, 1H, C(1)-*H*), 2.13 (t, *J* = 7.4, 2H, C(7')*H*₂), 1.97 (dd, *J* = 5.3, 15.0, 1H, C(8)-*H*_a), 1.73 – 1.66 (m, 2H, C(19')*H*₂), 1.66 – 1.59 (m, 2H, C(22')*H*₂), 1.59 – 1.52 (m, 2H, C(6')*H*₂), 1.52 (dd, *J* = 9.9, 15.0, 1H, C(8)-*H*_b), 1.52 – 1.45 (m, 2H, C(4')*H*₂), 1.43 – 1.33 (m, 4H, C(20')*H*₂, C(21')*H*₂), 1.30 – 1.23 (m, 2H, C(5')*H*₂), 1.04 (s, 3H, C(10)*H*₃); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.0 (C(8')), 175.9 (C(24')), 174.5 (C(17')), 173.9 (C(5)), 173.0 (C(1')), 138.2 (C(15')), 136.3 (C(12')), 130.1 (C(14')), 121.4 (C(13')), 83.6 (C(2)), 70.4 (C(1)), 52.0 (C(26')), 50.9 (C(7)), 41.8 (C(10')), 40.3 (C(3')), 2x 37.9 (C(8), C(18')), 36.9 (C(7')), 2x 35.9 (C(4), C(11')), 34.7 (C(23')), 3x 29.9 (C(4'), C(20'), C(21')), 27.4 (C(5')), 26.7 (C(19')), 26.6 (C(6')), 25.9 (C(22')), 24.9 (C(9)), 19.9 (C(10)), 15.5 (C(3)); **m/z**: 324 (44), 354 (17), 387 (15), 420 (100), 429 (34), 439 (12), 469 (17), 519 (22), 542 (18), 579 (28), 597 (22);

Exakte Masse: m/z für C₃₃H₄₈N₆O₆ [M-H]⁺ berechnet: 625.37081,
gefunden: 625.37214.

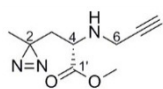


SAHA-CC 168: Zu einer Lösung von SAHA-CC **167** (19 mg, 30 µmol) in Wasser/THF (1:1, 2.0 ml) wurde LiOH (7 mg, 292 µmol) und unter Lichtausschluss bei

Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min konnte vollständiger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.49 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde nach Zugabe von 2m wässriger HCl (150 µl, 300 µmol) unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMA (1.0 ml) aufgenommen und mit DIPEA (6 µl, 35 µmol) und Ethylchlorformat (3 µl, 33 µmol) bei Raumtemperatur für 30 min gerührt. Anschließend wurde zu der Reaktionslösung eine Lösung aus Hydroxylaminhydrochlorid (6 mg, 86 µmol) und DIPEA (16 µl, 94 µmol) in DMA (0.5 ml) gegeben und weiter bei konstanter Temperatur gerührt. Über Nacht konnte ca. 60 %iger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.16 min) detektiert werden und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels MPLC (20 → 60 % MeCN) gereinigt und das Produkt **168** zu 75 % (7 mg, 11 µmol) bezogen auf wieder gewonnene freie Säure der Capture Compound (9 mg, 15 µmol) als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

¹H-NMR, MeOD δ: 7.47/7.16 (AA'/BB', *J* = 8.4, 4H, *H*_{arom.}), 4.29 (dd, *J* = 5.2, 9.9, 1H, C(7)-*H*), 3.39 (t, *J* = 7.1, 2H, C(10')*H*₂), 3.15 (dt, *J* = 2.2, 7.0, 2H, C(3')*H*₂), 2.75 (t, *J* = 7.1, 2H, C(11')*H*₂), 2.51 – 2.49 (m, 4H, C(3)*H*₂, C(4)*H*₂), 2.35 (t, *J* = 7.4, 2H, C(18')*H*₂), 2.09 (t, *J* = 7.4, 2H, C(23')*H*₂), 2.29 (t, *J* = 2.5, 1H, C(1)-*H*), 2.13 (t, *J* = 7.4, 2H, C(7')*H*₂), 1.97 (dd, *J* = 5.2, 14.9, 1H, C(8)-*H*_a), 1.73 – 1.66 (m, 2H, C(19')*H*₂), 1.66 – 1.59 (m, 2H, C(22')*H*₂), 1.59 – 1.52 (m, 2H, C(6')*H*₂), 1.52 – 1.46 (m, 2H, C(4')*H*₂), 1.50 (dd, *J* = 9.9, 15.0, 1H, C(8)-*H*_b), 1.42 – 1.36 (m, 4H, C(20')*H*₂, C(21')*H*₂), 1.30 – 1.22 (m, 2H, C(5')*H*₂), 1.04 (s, 3H, C(10)*H*₃); **¹³C-NMR, MeOD δ:** 176.0 (C(8')), 174.5 (C(17')), 173.9 (C(5)), 173.0 (C(1')), 172.9 (C(24')), 138.2 (C(15')), 136.3 (C(12')), 130.1 (C(14')), 121.4 (C(13')), 83.6 (C(2)), 70.4 (C(1)), 50.9 (C(7)), 41.8 (C(10')), 40.3 (C(3')), 37.9, 37.8 (C(8), C(18')), 36.9 (C(7')), 2x 35.9 (C(4), C(11')), 33.7 (C(23')), 2x 29.9 (C(20'), C(21')), 29.8 (C(4')), 27.4 (C(5')), 26.8, 2x 26.6 (C(19'), C(6'), C(22')), 24.9 (C(9)), 19.9 (C(10)), 15.5 (C(3)); **m/z:** 403 (8), 421 (100), 580 (16), 598 (41);

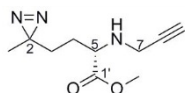
Exakte Masse: m/z für C₃₂H₄₇N₇O₆ [M-H]⁺ berechnet: 626.36606,
gefunden: 626.36614.



Scaffold 169: Eine Lösung von Photo-L-Leucin (11 mg, 73 μ mol) in 3M methanolischer HCl (2.0 ml) wurde bei 35 °C so lange gerührt bis im NMR-Spektrum kein weiterer Umsatz feststellbar war (3 d). Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Methylester in DMF (2.0 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von aktiviertem 4 Å Molsieb wurde DIPEA (25 μ l, 146 μ mol) und Propargylbromid (9 μ l, 80 μ mol) hinzu gegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Es wurde nur wenig Umsatz festgestellt und verteilt über drei weitere Tage noch 3 weitere Äquiv. Propargylbromid hinzu gegeben. Anschließend kein weiterer Umsatz mehr festgestellt werden (Methode: Kinetex, Produkt: 1.97 min). Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatographie (CH \rightarrow EA: 100:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 15:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 8:1 \rightarrow 6:1 \rightarrow ! 4:1) gereinigt. Das Scaffold **169** wurde zu 70 % (10 mg, 51 μ mol) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 3.77 (s, 3H, C(3') H_3), 3.47 (t, J = 7.2, 1H, C(4)- H), 3.43 (dd, J = 2.5, 17.0, 1H, C(6)- H_a), 3.36 (dd, J = 2.5, 17.0, 1H, C(6)- H_b), 2.61 (t, J = 2.5, 1H, C(8)- H), 1.71 (dd, J = 7.1, 14.7, 1H, C(3)- H_a), 1.54 (dd, J = 7.3, 14.7, 1H, C(3)- H_b), 1.05 (s, 3H, C(1) H_3); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 175.5 (C(1')), 81.7(C(7)), 73.4 (C(8)), 57.1 (C(4)), 52.6 (C(3')), 39.4 (C(3)), 37.0 (C(6)), 24.8 (C(2)), 20.0 (C(1)); **m/z:** 81 (6), 108 (26), 126 (100), 136 (74), 154 (13), 168 (28), 178 (6);

Exakte Masse: m/z für C₉H₁₃N₃O₂ [M-H]⁺ berechnet: 196.10805,
gefunden: 196.10779.

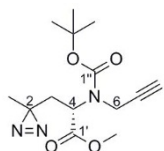


Scaffold 170: Eine Lösung von Photo-L-Methionin (32 mg, 204 μ mol) in 3M methanolischer HCl (2.0 ml) wurde bei 35 °C so lange gerührt bis im NMR-Spektrum kein weiterer Umsatz feststellbar war (4 d). Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Methylester in DMF (2.0 ml) aufgenommen. Nach der Zugabe von aktiviertem 4 Å Molsieb wurde DIPEA (70 μ l, 408 μ mol) und Propargylbromid (91 μ l, 816 μ mol) hinzu gegeben und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt, bis kein weitere Umsatz mehr festgestellt werden konnte (1.5 d, DC: DCM, R_F = 0.1). Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM \rightarrow DCM/MeOH: 100:1 \rightarrow 50:1 \rightarrow 25:1 \rightarrow 10:1) gereinigt. Das Scaffold **170** wurde zu 56 % (24 mg, 115 μ mol) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$, MeOD δ : 3.72 (s, 3H, C(3') H_3), 3.44 (m, 1H, C(5)- H), 3.40 (dd, J = 2.5, 16.9, 1H, C(7)- H_a), 3.33 (dd, J = 2.5, 16.9, 1H, C(7)- H_b), 2.59 (t, J = 2.5, 1H, C(9)- H), 1.61 – 1.39 (m, 4H, C(3) H_2 , C(4) H_2), 1.00 (s, 3H, C(1) H_3); **$^{13}\text{C-NMR}$, MeOD δ :** 175.7 (C(1')), 81.8 (C(8)),

73.3 (C(9)), 60.1 (C(5)), 52.4 (C(3')), 37.1 (C(7)), 31.4 (C(3)), 28.2 (C(4)), 26.3 (C(2)), 19.7 (C(1)); **m/z**: 85 (18), 104 (14), 122 (25), 132 (8), 150 (33), 164 (100), 168 (33), 186 (29), 192 (22), 205 (11)

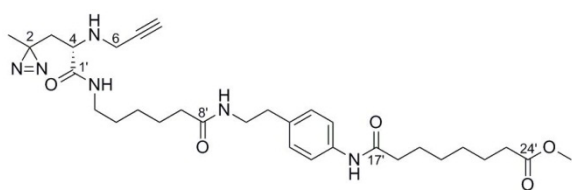
Exakte Masse: m/z für $C_{10}H_{15}N_3O_2$ $[M-H]^+$ berechnet: 210.12370,
 gefunden: 210.12329.



Scaffold 173: Zu einer Lösung von Scaffold **169** (28 mg, 143 μ mol) in MeOH (2.0 ml) wurde DIPEA (50 μ l, 286 μ mol) und Bocanhydrid (313 mg, 1.4 mmol) gegeben und für 2 d bei 40 °C gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM, R_F = 0.28) gereinigt. Das Scaffold **173** wurde zu 40 % (17 mg, 58 μ mol) als farbloses Öl erhalten.

1H -NMR, MeOD δ , Hauptrotamer: 4.28 (br. t, J = 7.1, 1H, C(4)-H), 4.26 (m, 1H, C(6)-H_a), 4.15 (br. d, J = 18.1, 1H, C(6)-H_b), 3.72 (s, 3H, C(3')H₃), 2.70 (br. s, 1H, C(8)-H), 2.15 (m, 1H, C(3)-H_a), 1.84 (m, 1H, C(8)-H_b), 1.42 (s, 9H, ^tBu), 1.08 (s, 3H, C(1)H₃); **^{13}C -NMR, MeOD δ :** 172.5 (C(1')), 155.8 (C(1'')), 83.0 (C(^tBu)), 81.2(C(7)), 74.2 (C(8)), 56.7 (C(4)), 52.8 (C(3')), 37.6 (C(6)), 36.7 (C(3)), 28.5 (C(^tBu)), 24.9 (C(2)), 20.3 (C(1)); **m/z**: 109 (9), 141 (15), 179 (17), 196 (20), 224 (32), 252 (100), 268 (13);

Exakte Masse: m/z für $C_{14}H_{21}N_3O_4$ $[M-H]^+$ berechnet: 296.16048,
 gefunden: 296.16047.



SAHA-CC 171: a) Zu einer Lösung des geschützten SAHA-Derivates **159** (16 mg, 31 μ mol) in DCM (2.0 ml) wurde TFA (239 μ l, 3.1 mmol) gegeben. Nach 30 min rühren bei Raumtemperatur konnte vollständiger Umsatz detektiert (Methode: Kinetex, freies Amin: 2.79 min) werden. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene freie Amin **159a** so weiter umgesetzt.

b) Zu einer Lösung von Scaffold **169** (6 mg, 31 μ mol) in THF/Wasser (2.0 ml, 1:1) wurde LiOH (7 mg, 292 μ mol) gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min konnte keine Säure mehr detektiert (DC, DCM/MeOH - 10:1, R_F = 0.91) werden und das Lösemittel wurde nach Zugabe von 2M wässriger HCl (169 μ l, 338 μ mol) unter vermindertem Druck entfernt und die freie Säure **127a** so weiter umgesetzt.

Die aus den Schritten a) und b) erhaltenen Substanzen **159a** und **127a** wurden zusammen in DMA (2.0 ml) gelöst und anschließend mit DIPEA (26 μ l, 152 μ mol) und HATU (12 mg, 32 μ mol) versetzt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach 1 h konnte

50 %iger Umsatz (Methode: Kinetex, Produkt: 3.33 min) detektiert werden, der konstant blieb. Trotz Zugabe von je 1 Äquiv. DIPEA und HATU konnte keine weitere Produktbildung beobachtet werden. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mittels MPLC (20 → 50 % MeCN) gereinigt. Das Produkt **171** konnte zu 39 % (7 mg, 12 µmol) als farbloser amorpher Feststoff isoliert werden.

¹H-NMR, MeOD: 7.47/7.16 (AA'/BB', $J = 8.5$, 4H, $H_{\text{arom.}}$), 3.64 (s, 3H, C(26') H_3), 3.42 (dd, $J = 2.5$, 17.0, 1H, C(6)- H_a), 3.39 (t, $J = 7.2$, 2H, C(10') H_2), 3.25 (t, $J = 7.1$, 1H, C(4)- H), 3.24 (dd, $J = 2.6$, 17.0, 1H, C(6)- H_b), 3.20 (dt, $J = 4.0$, 7.1, 2H, C(3') H_2), 2.76 (t, $J = 7.2$, 2H, C(11') H_2), 2.61 (t, $J = 2.5$, 1H, C(8)- H), 2.35 (t, $J = 7.4$, 2H, C(18') H_2), 2.33 (t, $J = 7.4$, 2H, C(23') H_2), 2.14 (t, $J = 7.4$, 2H, C(7') H_2), 1.73 – 1.66 (m, 2H, C(19') H_2), 1.68 (dd, $J = 6.4$, 14.7, 1H, C(3)- H_a), 1.66 – 1.59 (m, 2H, C(22') H_2), 1.61 – 1.54 (m, 2H, C(6') H_2), 1.57 – 1.49 (m, 2H, C(4') H_2), 1.49 (dd, $J = 7.8$, 14.7, 1H, C(3)- H_b), 1.41 – 1.36 (m, 4H, C(20') H_2 , C(21') H_2), 1.33 – 1.26 (m, 2H, C(5') H_2), 1.05 (s, 3H, C(1) H_3); **¹³C-NMR, MeOD δ :** 2x 176.0 (C(8'), C(24')), 175.3 (C(1')), 174.5 (C(17')), 138.2 (C(15')), 136.3 (C(12')), 130.1 (C(14')), 121.4 (C(13')), 81.9 (C(7)), 73.4 (C(8)), 58.6 (C(4)), 52.0 (C(26')), 41.8 (C(10')), 40.2 (C(3')), 39.8 (C(3)), 37.9 (C(18')), 37.0 (C(6)), 36.9 (C(7')), 35.9 (C(11')), 34.7 (C(23')), 30.0 (C(4')), 2x29.9 (C(20'), C(21')), 27.5 (C(5')), 26.7 (C(19')), 26.6 (C(6')), 25.9 (C(22')), 24.8 (C(2)), 20.1 (C(1)); **m/z:** 324 (15), 420 (14), 429 (21), 513 (18), 555 (100), 579 (5);

182

5 Literaturverzeichnis

- [1] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Biochemie - Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, Springer-Verlag, **2008**.
- [2] J. Klose, *Hum. Genet.* **1975**, *26*, 231–243.
- [3] P. H. O’Farell, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007–4021.
- [4] L. Ly, V. C. Wasinger, *Proteomics* **2011**, *11*, 513–534.
- [5] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 501–510.
- [6] F. Landi, C. M. Johannsson, D. J. Campopiano, A. N. Hulme, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56–59.
- [7] Y. Liu, P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [8] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686–4687.
- [9] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000–10005.
- [10] H. Köster, D. P. Little, P. Luan, R. Muller, S. M. Siddiqi, S. Marappan, P. Yip, *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*, 381–390.
- [11] Y. Luo, C. Blex, O. Baessler, M. Glinski, M. Dreger, M. Sefkow, H. Köster, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 2843–2856.
- [12] C. Dahlhoff, M. Hüben, T. Lenz, P. Poot, E. Nordhoff, H. Köster, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 256–265.
- [13] F. Kroll, M. Dreger, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 1613–1617.
- [14] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006–3008.
- [15] Y. Tanaka, M. R. Bondab, J. J. Kohler, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 473–480.
- [16] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479–12520.
- [17] N. P. Gritsan, M. S. Platz, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3844–3867.
- [18] L. A. Paquette, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *29*, 2027–2031.
- [19] O. Chapman, E. D. Hoganson, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 498–500.

- [20] J. F. W. Keana, S. X. Cai, *J. Fluorine Chem.* **1989**, *43*, 151–154.
- [21] J. F. Keana, S. X. Cai, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640–3647.
- [22] T. S. Godovikova, M. V. Serebriakova, P. V. Alekseyev, N. I. Komarova, M. M. Shakirov, A. Y. Denisov, T. V. Popova, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *61*, 68–77.
- [23] R. F. R. Church, M. J. Weiss, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2465–2471.
- [24] I. D. R. Stevens, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, *5*, 661–667.
- [25] T. Durek, J. Zhang, C. He, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5497–5500.
- [26] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.
- [27] J. J. Fischer, S. Michaelis, A. K. Schrey, A. Diehl, O. Y. Graebner, J. Ungewiss, S. Horzowski, M. Glinski, F. Kroll, M. Dreger, H. Koester, *Proteomics* **2011**, *11*, 1–9.
- [28] C. Dalhoff, Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, **2005**.
- [29] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [30] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, *Biochemie*, (Hrsg.: A. Bob, K. Bob), Thieme, **2006**.
- [31] L. K. Gediya, P. Chopra, P. Purushottamachar, N. Maheshwari, V. C. O. Njar, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5047–5051.
- [32] W. Xu, L. Ngo, G. Perez, M. Dokmanovic, P. A. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15540–15545.
- [33] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [34] J. Zempleni, Y. I. H. S. S. Wijeratne, *Expert Rev Endocrinal Metab.* **2003**, *3*, 715–724.
- [35] Y.-Y. Yang, J. M. Ascano, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3640–3641.
- [36] S. S. van Berkel, A. T. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pinggen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1805–1815.
- [37] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168–3178.
- [38] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [39] A. Serganov, S. Keiper, L. Malinina, V. Tereshko, E. Skripkin, C. Höbartner, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. Wombacher, R. Micura, Z. Dauter, A. Jäschke, D. J. Patel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 218–224.
- [40] K. E. Litz, *Molecules* **2007**, *12*, 1674–1678.
- [41] W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655.
- [42] K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062–5064.

- [43] K. B. Sharpless, H. C. Kolb, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [44] A. Michael, *J. prakt. Chem.* **1893**, *48*, 94.
- [45] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604–637.
- [46] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Folkin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [47] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [48] C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1171–1176.
- [49] C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2184–2194.
- [50] M. Daghighi, L. Henning, M. Findeisen, S. Giesa, F. Schümer, H. Henning, G. Beck-Sickinger, P. Welzel, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2404–2408.
- [51] S. M. Lamos, C. J. Krusemark, C. J. McGee, M. Scalf, L. M. Smith, P. J. Belshaw, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4435–4439.
- [52] A. Sinz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 670–673.
- [53] M. Bogyo, S. H. L. Verhelst, M. Fonovic, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284–1286.
- [54] M. Bogyo, M. Fonovic, S. H. L. Verhels, M. T. Sorum, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761–1770.
- [55] G. Blobel, J. B. Denny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5286–5290.
- [56] Y.-Y. Yang, M. Grammel, A. S. Raghavan, G. Charron, H. C. Hang, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1212–1222.
- [57] J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dietrich, E. M. Schuman, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351–18360.
- [58] K. Fang, M. Hashimoto, S. Jockusch, N. J. Turro, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8543–8544.
- [59] H. Schupp, W. K. Wong, W. Schnabel, *J. Photochem* **1987**, *36*, 85–97.
- [60] R. Serwa, I. Wilkening, G. D. Signore, M. Mühlberg, I. Claußnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382–8287.
- [61] G. Zhou, X. Yan, D. Wu, S. J. Kron, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1917–1924.
- [62] V. Böttger, L.-E. Peters, B. Micheel, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 191–197.
- [63] F. Sellrie, A. Warsinke, B. Micheel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 206–210.
- [64] B. Micheel, P. Jantscheff, V. Böttger, G. Scharte, G. Kaiser, P. Stolley, L. Karawajew, *J. Immunol. Methods* **1988**, *11*, 89–94.
- [65] J. A. Schenk, F. Sellrie, V. Böttger, A. Menning, W. F. S. B. Micheel, *Biochimie* **2007**, *89*, 1304–1311.

- [66] S. B. Park, J. Park, H. Y. Lee, M.-H. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2018–2022.
- [67] R. Marouga, S. David, E. Hawkins, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 669–678.
- [68] Z.-C. Wang, D. E. D.-L. Batu, Y.-L. Saixi, B. Zhang, L.-Q. Ren, *Molecules* **2011**, *16*, 3048–3065.
- [69] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- [70] A. Speicher, T. Klaus, T. Eicher, *J. prakt. Chem.* **1998**, *340*, 581–583.
- [71] K. D. Janda, M. M. Meijler, G. F. Kaufmann, L. Qi, J. M. Mee, A. R. Coyle, J. A. Moss, P. Wirsching, M. Matsushita, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2477–2484.
- [72] F. Song, S. Watanabe, P. E. Floreancig, K. Koide, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16460–16461.
- [73] J. C. Menendez, P. Cledera, C. Avendafio, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12349–12360.
- [74] H. Juwarker, J. M. Lenhardt, D. M. Pham, S. L. Craig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3740–3743.
- [75] A. I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4646–4658.
- [76] A. Keller, A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5383–5392.
- [77] H. Kessler, A. Bausch, U. Hersel, C. Dahmen, J. Auernheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16107–16110.
- [78] F. Tibiletti, M. Soimonetti, K. M. Nicholas, G. Palmisano, M. Parravicini, F. Imbesi, S. Tollari, A. Penoni, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1280–1288.
- [79] M. R. Banghart, A. Mouro, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Traumer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9261–9265.
- [80] S. S. Husain, S. Nirthan, D. Ruesch, K. Solt, Q. Cheng, G.-D. Li, E. Arevalo, R. W. Olsen, D. E. Raines, S. A. Forman, J. B. Cohen, K. W. Miller, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4818–4825.
- [81] H. Nakashima, M. Hashimoto, Y. Sdakane, T. Tomohiro, Y. Hatanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15092–15093.
- [82] R. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 863–874.
- [83] R. Fochi, C. Magistris, *Synthesis* **2007**, *22*, 3497–3506.
- [84] R. Fochi, C. Magistris, *Synthesis* **2007**, *7*, 1096–1102.
- [85] Y. Xu, Y. Suzuki, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3281–3284.
- [86] P. L-Golas, K. Matyjaszewski, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1338–1354.

- [87] Y. Nakamura, S. Inomata, M. Ebine, Y. Manabe, I. Iwakura, M. Ueda, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 83–85.
- [88] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [89] C. L. Droumaquet, C. Wang, Q. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1233–1239.
- [90] S. K. Mamidyala, M. G. Finn, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1252–1261.
- [91] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- [92] K. D. Hänni, D. A. Leigh, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1240–1251.
- [93] M. T. Mchedlidze, N. V. Sumbatyan, D. A. Bondar, M. V. Taranenko, G. A. Korshunova, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29*, 177–184.
- [94] R. Serwa, I. Wilkening, G. D. Signore, M. Mühlberg, I. Claußnitzer, C. Weise, M. Gerrits, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8382–8387.
- [95] C. Mioskowski, P. Oudet, L. Lebeau, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1697–1706.
- [96] G. Koripelly, W. Saak, J. Christoffers, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5840–5846.
- [97] D. M. Dishong, G. W. Gokel, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 147–148.
- [98] L. I. Willems, M. Verdoes, B. I. Florea, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1769–1781.
- [99] R. Konsoula, M. Jung, *J. Int. Pharm.* **2008**, *361*, 19–25.
- [101] M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576–2579.
- [102] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.